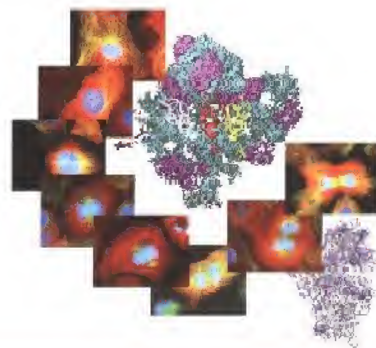
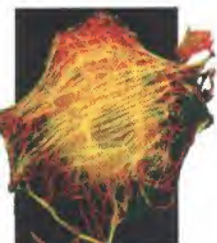
# Contenido

Cooper's

# La Célula





## Sección I. **Introducción**

# contenido





## Sección II. **Flujo de la información genética**

# contenido

## contenido

## contenido

contenido

## contenido



# Sección IV. Regulación celular

contenido

# Organización y características de *La Célula*

*La Célula* ha sido diseñado para ser un texto de fácil comprensión y enseñanza que puede ser cubierto en un solo semestre, a la vez que permite a los estudiantes dominar el material de todo el libro. Damos por hecho que se poseen ciertos conocimientos generales de biología y química aunque no suponemos que se tengan en las áreas de química orgánica, bioquímica o biología molecular. Muchos aspectos en la organización y características del libro nos ayudarán a acercarnos a la materia.

## Organización

*La Célula* se divide en cuatro partes, cada una de ellas es independiente, por lo que el orden y los temas pueden variar fácilmente según las necesidades de cada curso.

La *sección I* del libro aborda los orígenes de la evolución de las células, sus métodos de estudio, su composición química y los fundamentos de la biología molecular moderna. Para aquellos estudiantes que tengan una gran formación en cursos de introducción a la biología o en cursos previos de biología molecular, pueden obviar varias partes de este libro o pueden usarlas de repaso.

La *sección II* se centra en la biología molecular de las células así como en la organización y secuencias del genoma: duplicación, reparación y combinación de fragmentos de ADN, trascripción del ARN; y síntesis, procesos y regulación de proteínas. Los capítulos están ordenados siguiendo el mismo orden de la información genética (ADN → ARN → proteína) y proporciona un conciso pero actual campo de visión de estas materias.

La *sección III* analiza la estructura y funcionamiento de la célula: núcleo, orgánulos citoplasmáticos, citoesqueleto y superficie celular. Esta parte del libro comienza adaptando lo mencionado en la sección II sobre biología molecular a las células eucarióticas y continúa a través de los orgánulos del citoplasma y citoesqueleto hasta la membrana plasmática. Sin embargo, estos capítulos son relativamente independientes y pueden tratarse en distinto orden, según sean más apropiados para un curso en concreto.

Finalmente, la *sección IV* comprende los mecanismos de regulación de las actividades de la célula, tratando temas como los estímulos celulares, el ciclo de la célula y la muerte controlada de células. Esta cuarta parte concluye con un capítulo sobre el cáncer que sintetiza las consecuencias de los fallos de los mecanismos básicos de funcionamiento de las células.

# Organización y características de *La Célula*

## Características

Para ayudar a los estudiantes a dominar e integrar los contenido de *La Célula,* se han incorporado varias características que se han organizado para guiar a los estudiantes en el trato con este libro de la siguiente manera:

*Organización de capítulos.* Cada capítulo se divide en cuatro o cinco secciones principales, las cuales están a su vez divididas en un número similar de apartados. Un esquema de las secciones principales al principio de cada capítulo muestra de modo rápido la organización de cada uno de ellos.

*Términos claves y glosario.* Los términos claves aparecen en negrita a lo largo del capítulo, además de enunciarse en el sumario y definirse en el glosario de final del libro.

*Ilustraciones y microfotografías.* Se ha desarrollado cuidadosamente un completo programa de ilustración a todo color y de microfotografías para complementar y reforzar visualmente el texto.

*Experimentos y ensayos de medicina molecular.* Cada capítulo contiene dos Experimentos clave o un Experimento clave y características de Medicina molecular. Estas prácticas tienen por objeto el instruir al lector en las bases experimentales de la célula y la biología molecular y sus aplicaciones a la medicina moderna. Las prácticas también pueden utilizarse como bases útiles para discusiones de estudiantes, que pueden acompañarse con una revisión del texto original sobre el que se basan los Experimentos clave.

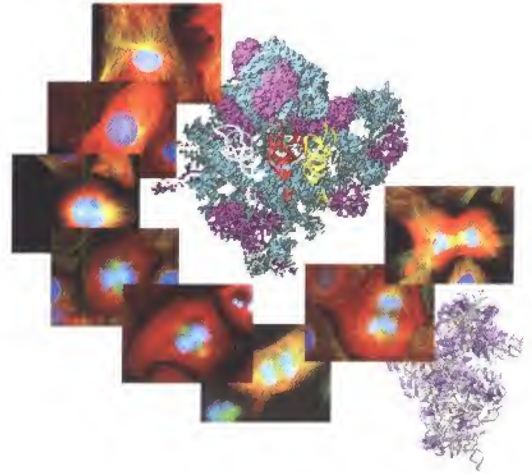
*Resumen de capítulo.* El sumario está organizado a modo de esquema, que corresponde a las sucesivas divisiones en secciones y apartados de cada capítulo. Este formato se acompaña de una lista con los términos claves, proporcionando así un conciso repaso del material.

*Preguntas y respuestas.* Una extensa batería de preguntas al final de cada capítulo (con las respuestas al final del libro) tienen como propósito facilitar la revisión del material de cada capítulo y animar a los estudiantes a usar dicho material para predecir o interpretar los resultados experimentales.

*Bibliografía.* Las listas bibliográficas del final de cada capítulo permiten el acceso rápido a las páginas correspondientes del libro. Para ayudar a identificar artículos de interés, las referencias están organizadas de acuerdo con las secciones de los capítulos. Los artículos de interés y las páginas importantes se identifican con las iniciales [R] y [P] respectivamente.

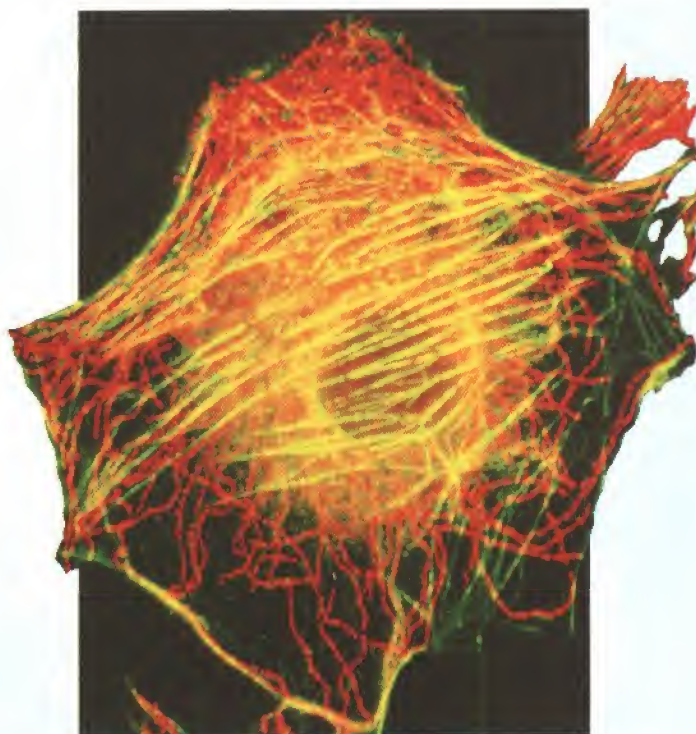
Cooper's

# La Célula



*Sección* **I**

# *Introducción*



# 1

# Visión global de la célula e investigación celular



LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS CÉLULAS es un área de investigación activa cuyo entendimiento es fundamental para todas las ciencias biológicas. Esto es cierto no sólo desde el punto de partida de la ciencia básica, sino también respecto a un número creciente de aplicaciones prácticas en agricultura, biotecnología y medicina. Especialmente tras haber completado la secuencia del genoma humano, el progreso de la biología celular y molecular está abriendo nuevos horizontes en la práctica médica. Ejemplos llamativos incluyen el desarrollo de nuevos fármacos especialmente diseñados para interferir con el crecimiento de células cancerosas y con el uso potencial de células madre para sustituir tejidos dañados y tratar pacientes que padecen condiciones como la diabetes, enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, lesiones de la médula espinal y enfermedades cardíacas.

Dado que la biología celular y molecular es un campo de investigación de rápido crecimiento, este capítulo se centrará en cómo se estudian las células, así como servirá para revisar sus propiedades básicas. La apreciación de las similitudes y diferencias entre las células resulta particularmente importante para entender la biología celular. La primera sección de este capítulo por lo tanto discutirá la unidad y la diversidad de las células presentes hoy en dia en términos de su evolución desde un ancestro común. Por otra parte, todas las células comparten propiedades fundamentales que se han conservado a través de la evolución. Por ejemplo, todas las células utilizan ADN como material genético, están rodeadas por una membrana plasmática y usan los mismos mecanismos básicos para el metabolismo energético. Por otro lado, las células actuales han evolucionado en diferentes estilos de vida. Muchos organismos, como las bacterias, amebas y levaduras, se componen de células únicas capaces de autorreplicarse independientemente. Los organismos más complejos están compuestos por una colección de células que funcionan de manera coordinada, con diferentes células especializadas para desarrollar funciones particulares. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto de más de 200 tipos diferentes de células, cada una de ellas especializada para cada función distintiva como la memoria, la vista, el movimiento, o la digestión. La diversidad exhibida por los diferentes tipos de células es sorprendente; por ejemplo, consideremos las diferencias entre las bacterias y las células del cerebro humano.

Las similitudes fundamentales entre los diferentes tipos de células proporcionan un marco común para la biología celular, permitiendo que los principios básicos aprendidos a partir de experimentos con un solo tipo de célula puedan ser extrapolados y generalizados a otros tipos de células. Diversos tipos de células y organismos son extensamente utilizados para estudiar los diferentes aspectos de la biología celular y molecular; la segunda sección de este capítulo discute algunas de las propiedades de estas células que las hacen particularmente valiosas

como modelos experimentales. Finalmente, es importante reconocer que el progreso de la biología celular depende también de los instrumentos experimentales que permiten a los científicos hacer nuevas observaciones o desarrollar experimentos novedosos. Este capítulo de presentación concluye por tanto con una discusión acerca de algunos experimentos utilizados para el estudio de las células, a la vez que resume algunos de los descubrimientos históricos que han llevado a nuestro conocimiento actual sobre la estructura de la célula y su función.

## Origen y evolución de las células

Las células se dividen en dos clases principales, inicialmente definidas según donde situaran al núcleo. Las **células procariotas** (bacterias) carecen de envoltura nuclear; las **células eucariotas** presentan un núcleo donde el material genético está separado del citoplasma. Las células procariotas son generalmente más pequeñas y simples que las células eucariotas; además de la ausencia de núcleo, sus genomas son menos complejos y no contienen orgánulos citoplasmáticos o citoesqueleto (Tabla 1.1). Al margen de estas diferencias, los mismos mecanismos moleculares básicos gobiernan las vidas de procariotas y eucariotas, indicando que todas las células presentes hoy descienden de un ancestro primordial único. ¿Cómo se desarrolló la primera célula? ¿Y cómo evolucionaron la complejidad y la diversidad que exhiben las células actuales?

### *La primera célula*

Parece ser que la vida emergió hace, al menos, 3.800 millones de años, aproximadamente 750 millones de años después de que se formara La Tierra (Fig. 1.1). Cómo se originó la vida y cómo la primera célula se convirtió en un ser son cuestiones de especulación, puesto que estos acontecimientos no pueden reproducirse en el laboratorio. No obstante, diferentes tipos de experimentos han proporcionado evidencias importantes sobre algunos pasos del proceso.

En 1920 se sugirió por primera vez que moléculas orgánicas simples podrían polimerizar espontáneamente y formar macromoléculas bajo las condiciones que se pensaba que existían en la atmósfera primitiva. En el momento en el que surgió la vida, la atmósfera de La Tierra se piensa que contenía poco o nada oxígeno libre, constando principalmente de $CO_2$ y $N_2$ además de pequeñas cantidades de gases como $H_2$, $H_2S$, y CO. Tal atmósfera proporciona condiciones reductoras en las que las moléculas orgánicas, con una fuente de energía como la luz solar o descargas eléctricas, se pueden formar espontáneamente. La formación espontánea de las moléculas orgánicas fue demostrada por primera vez experimentalmente en los años 50, cuando Stanley Miller (un estudiante graduado en aquel entonces) demostró que la descarga de chispas eléctricas en una mezcla de $H_2$, $CH_4$, y $NH_3$, en presencia de agua, conducía a la formación de una variedad de moléculas orgánicas, incluyendo varios aminoácidos (Fig. 1.2). Aunque el experimento de Miller no reprodujo con precisión las

**TABLA 1.1.** Células procariotas y eucariotas

| Características | Procariota | Eucariota |
|---|---|---|
| Núcleo | Ausente | Presente |
| Diámetro de una célula típica | ~1 μm | 10-100 μm |
| Citoesqueleto | Ausente | Presente |
| Orgánulos citoplasmáticos | Ausentes | Presentes |
| Contenido de ADN (pares de bases) | $1 \times 10^6$ a $5 \times 10^6$ | $1{,}5 \times 10^7$ a $5 \times 10^9$ |
| Cromosomas | Una molécula de ADN circular | Múltiples moléculas de ADN linear |

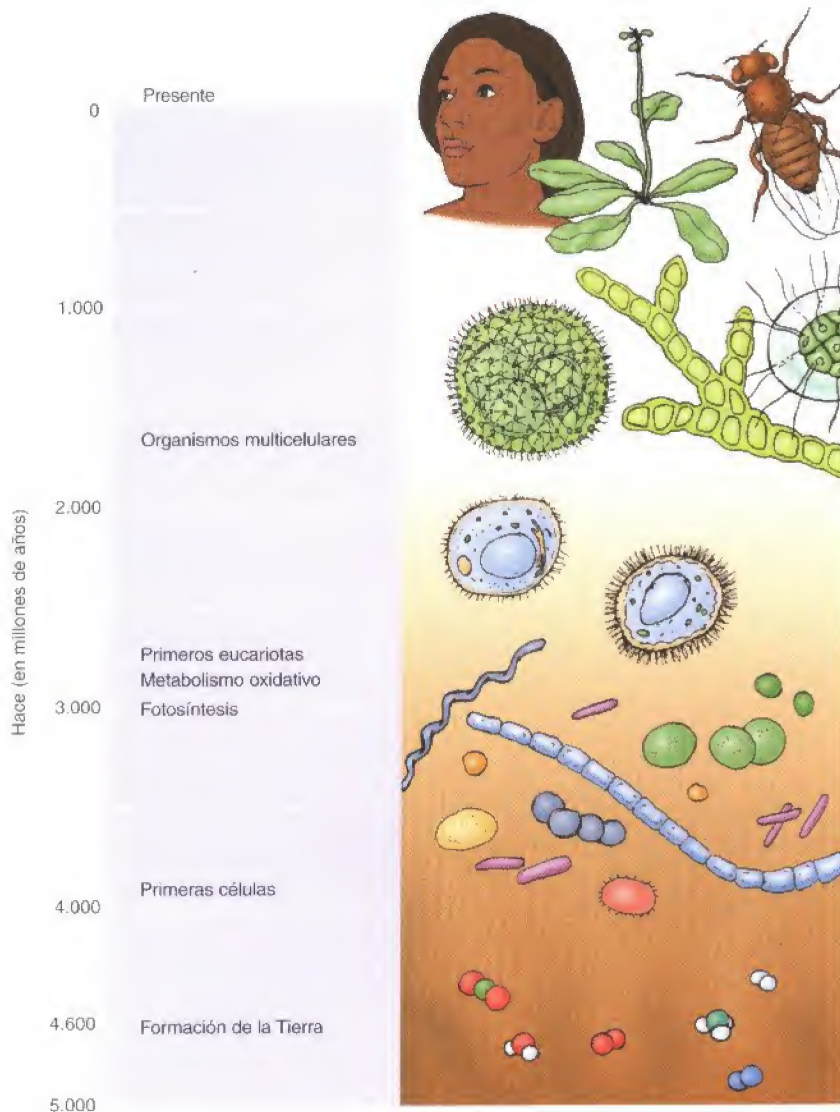



*Figura 1.1*
**Escala temporal de la evolución.** La escala indica el momento aproximado en el que ocurrieron algunos de los acontecimientos más importantes en la evolución de las células.

condiciones primitivas de La Tierra, claramente demostró la plausibilidad de la síntesis espontánea de las moléculas orgánicas, proporcionando los materiales básicos desde donde surgieron los primeros organismos vivos.

El siguiente paso en la evolución fue la formación de las macromoléculas. Se ha demostrado que los bloques monoméricos que constituyen las macromoléculas se polimerizan espontáneamente bajo condiciones prebióticas plausibles. El calentamiento de mezclas secas de aminoácidos, por ejemplo, da como resultado su polimerización para formar polipéptidos. Pero la característica fundamental de la macromolécula de la que surgió la vida debe tener la habilidad de replicarse por sí misma. Solamente una macromolécula capaz de dirigir la síntesis de nuevas copias de si misma sería capaz de reproducirse y evolucionar.

De las dos clases principales de macromoléculas que aportan información en las células actuales (ácidos nucleicos y proteínas), solo los ácidos nucleicos son capaces de dirigir su propia replicación. Los ácidos nucleicos pueden servir

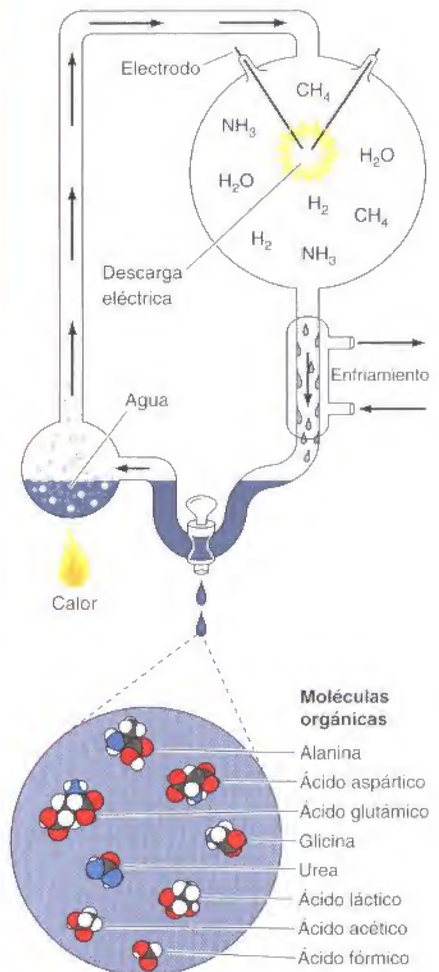



*Figura 1.2*
**Formación espontánea de las moléculas orgánicas.** El vapor de agua se expulsaba a una atmósfera que consistía en $CH_4$, $NH_3$ y $H_2$, en la que se descargaban chispas de electricidad. El análisis de los productos de la reacción reveló la formación de varias moléculas orgánicas, incluyendo los aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y glicina.

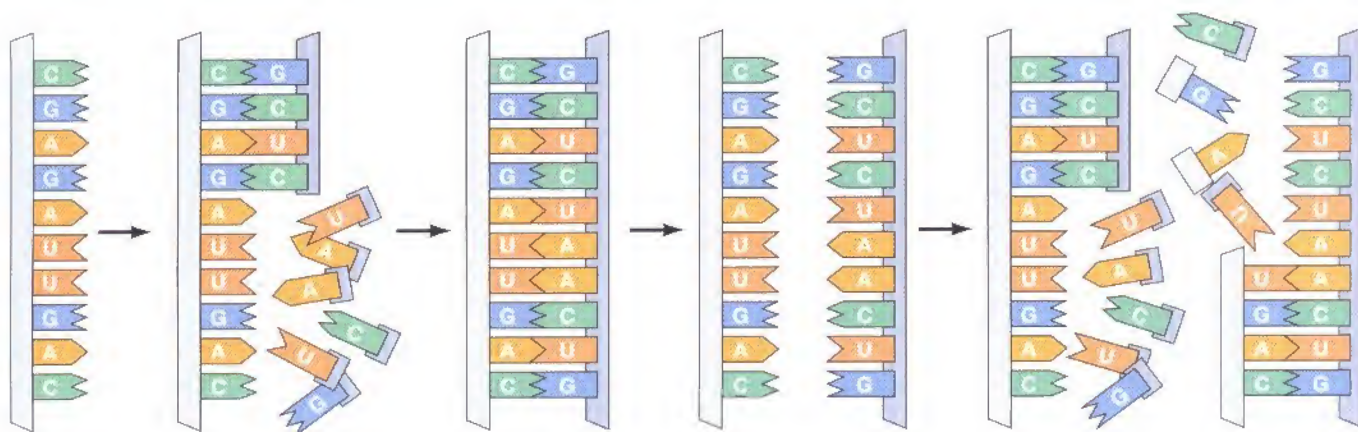


*Figura 1.3*
**Autorreplicación propia del ARN.** Las parejas complementarias entre los nucleótidos (adenina [A] con uracilo [U] y guanina [G] con citosina [C]) permiten que una hebra de ARN sirva como molde para la síntesis de una nueva hebra con la secuencia complementaria.

como molde para su propia síntesis como resultado del apareamiento de bases específicas entre nucleótidos complementarios (Fig. 1.3). Uno de los pasos críticos en el aprendizaje de la evolución molecular ocurrió a principios de los años 80, cuando se descubrió en los laboratorios de Sid Altman y Tom Cech que el ARN es capaz de catalizar numerosas reacciones químicas, incluyendo la polimerización de nucleótidos. El ARN es, por tanto, el único capaz de servir como molde y catalizar su propia replicación. Como consecuencia, se cree que el ARN ha sido el sistema genético inicial, y que una etapa temprana de la evolución química estuvo basada en moléculas de ARN con replicación propia —un período de la evolución conocido como el **mundo del ARN**—. Las interacciones en orden entre el ARN y los aminoácidos evolucionaron a lo que hoy es el código genético, y eventualmente el ADN reemplazó al ARN como el material genético.

La primera célula, se presupone, que surgió de la envoltura del ARN de replicación propia en una membrana compuesta por **fosfolípidos** (Fig. 1.4). Tal y como se discutirá en detalle en el próximo capítulo, los fosfolípidos son los componentes básicos de todas las membranas biológicas presentes hoy día, incluyendo la membrana plasmática de células procariotas y eucariotas. La característica clave de los fosfolípidos que forman las membranas es que son moléculas **anfipáticas**, lo que quiere decir que una porción de la molécula es soluble en agua y la otra porción no. Los fosfolípidos presentan largas cadenas hidrocarbonadas insolubles en agua (**hidrofóbicas**) unidas a grupos solubles

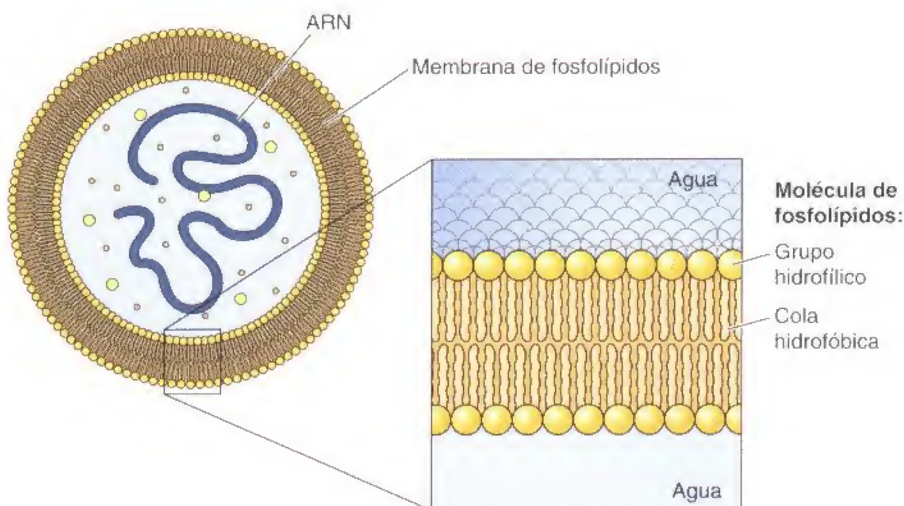



*Figura 1.4*
**Recubrimiento del ARN de autorreplicación con una membrana de fosfolípidos.** Se cree que la primera célula surgió del recubrimiento del ARN *autorreplicante* y sus moléculas asociadas por una membrana compuesta de fosfolípidos. Cada molécula de fosfolípidos presenta dos largas colas hidrofóbicas unidas a un grupo hidrofílico. Las colas hidrofóbicas están embebidas en la bicapa lipídica; las cabezas hidrofílicas están expuestas al agua a ambos lados de la membrana.

en agua (**hidrofílicos**) que contienen fosfatos. En contacto con el agua, los fosfolípidos espontáneamente se agrupan en una bicapa con los grupos que contienen fosfatos en el exterior en contacto con el agua y sus colas hidrocarbonadas en el interior en contacto unas con otras. Esta bicapa fosfolipídica forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos —por ejemplo, separando el interior de la célula de su ambiente externo—.

La envoltura del ARN *autorreplicante* y las moléculas asociadas a una membrana lipídica se han mantenido, por tanto, como una unidad, capaz de reproducirse a sí misma y evolucionar. La síntesis de proteínas a partir del ARN pudo ya haber evolucionado, en cuyo caso la primera célula consistiría en un ARN de replicación propia y sus proteínas codificadas.

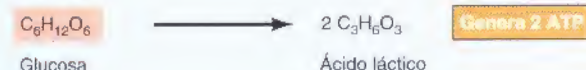
## *Evolución del metabolismo*

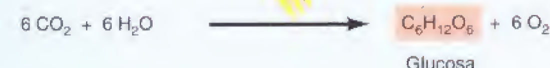
Debido a que las células se originaron en un mar de moléculas orgánicas, éstas eran capaces de obtener alimento y energía directamente de su ambiente. Pero una situación como ésta es limitada en sí misma, por lo que las células necesitaron evolucionar sus propios mecanismos de creación de energía y sintetizar las moléculas necesarias para su replicación. La creación y la utilización controlada de la energía metabólica es primordial para todas las actividades celulares, y los procesos principales de metabolismo energético (discutidos en detalle en el Cap. 2) se han conservado prácticamente intactos en las células actuales. Todas las células utilizan **adenosina 5'-trifosfato** (ATP) como fuente de energía metabólica para llevar a cabo la síntesis de los constituyentes celulares y conducir otras actividades que requieren energía, como el movimiento (p. ej., la contracción muscular). Los mecanismos utilizados por las células para generar ATP han evolucionado en tres etapas, correspondientes a la evolución de la glicolisis, fotosíntesis y metabolismo oxidativo (Fig. 1.5). El desarrollo de estos procesos metabólicos cambió la atmósfera de la Tierra, en consecuencia alterando el curso de la evolución.

En la atmósfera anaerobia inicial de la Tierra, las primeras reacciones generadoras de energía presumiblemente implicaron la escisión de moléculas orgánicas en ausencia de oxígeno. Estas reacciones parecen ser una forma de la actual **glicolisis** —la rotura anaerobia de la glucosa a ácido láctico, con la ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP. Además de utilizar ATP como su fuente de energía química intracelular, todas las células actuales llevan a cabo la glicolisis, de acuerdo con la idea de que estas reacciones surgieron muy pronto en la evolución.

La glicolisis proporcionó un mecanismo mediante el cual la energía en moléculas orgánicas ya formadas (p. ej., la glucosa) podía convertirse en ATP, que



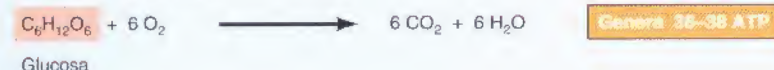




*Figura 1.5*
**Generación de energía metabólica.** La glicólisis es la rotura anaerobia de la glucosa en ácido láctico. La fotosíntesis utiliza la energía del sol para conducir la síntesis de la glucosa a partir del $CO_2$ y el $H_2O$, liberando $O_2$ como producto. El $O_2$ liberado por la fotosíntesis lo utiliza el metabolismo oxidativo, en el que la glucosa se rompe en $CO_2$ y $H_2O$, liberando mucha más energía que la obtenida de la glicólisis.

podía ser utilizado como fuente de energía para dirigir otras reacciones metabólicas. El desarrollo de la **fotosíntesis** fue el siguiente paso más importante de la evolución, que permitió a la célula generar energía a partir de la luz solar y ser independientes de la utilización de las moléculas orgánicas ya existentes. La primera bacteria fotosintética, que evolucionó hace más de 3 billones de años, probablemente utilizaba $H_2S$ para convertir $CO_2$ en moléculas orgánicas —todavía algunas bacterias utilizan un proceso de fotosíntesis similar. La utilización de $H_2O$ como donante de electrones e hidrógeno para la conversión del $CO_2$ a compuestos orgánicos evolucionó más tarde y tuvo la importante consecuencia de cambiar la atmósfera de la Tierra. El uso de $H_2O$ en reacciones fotosintéticas produce $O_2$ libre; se cree que este mecanismo ha sido el responsable de hacer a la atmósfera de la Tierra tan abundante en $O_2$.

La liberación de $O_2$ como consecuencia de la fotosíntesis cambió el medio en el que las células evolucionaron y se cree que determinó el desarrollo del **metabolismo oxidativo**. Alternativamente, el metabolismo oxidativo podría haber evolucionado antes que la fotosíntesis, y el aumento del $O_2$ atmosférico proporcionaría una importante ventaja selectiva a los organismos capaces de utilizar $O_2$ en las reacciones de generación de energía. En cualquier caso, el $O_2$ es una molécula altamente reactiva, y el metabolismo oxidativo, usando esta reactividad, ha proporcionado un mecanismo de generación de energía a partir de moléculas orgánicas mucho más eficiente que la glicolisis anaerobia. Por ejemplo, la rotura oxidativa completa de la glucosa en $CO_2$ y $H_2O$ produce energía equivalente a 36 ó 38 moléculas de ATP, en comparación con las 2 moléculas de ATP que se forman en la glicolisis anaerobia. Con pocas excepciones, las células actuales utilizan reacciones oxidativas como fuente principal de energía.

*Figura 1.6*
**Micrografía electrónica de *E. coli*.** La célula está rodeada por una pared celular, dentro de la que se encuentra la membrana plasmática. El ADN se encuentra en el nucleoide. (Menge and Wurtz/Biozentrum, University of Basel/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)




## *Procariotas actuales*

Los procariotas actuales, que incluyen todos los tipos de bacterias, están divididos en dos grupos —las **arquebacterias** y las **eubacterias**— que se diferenciaron al principio de la evolución. Algunas arquebacterias viven en condiciones extremas, que hoy en día son inusuales pero que pudieron prevalecer en la primitiva Tierra. Por ejemplo, los termoacidófilos viven en pozos calientes de sulfuro con temperaturas hasta de 80 °C y valores de pH de 2. Las eubacterias incluyen las formas comunes que están presentes en nuestros días —un amplio grupo de organismos que viven en una gran variedad de ambientes, como la tierra, el agua, y otros organismos (p. ej., los patógenos humanos).

La mayoría de las células bacterianas son esféricas, en forma de bastón, o espiral, con diámetros que oscilan de 1 a 10 μm. Su contenido de ADN varía desde unos 0,6 millones a 5 millones de pares de bases, cantidad suficiente para codificar unas 5.000 proteínas diferentes. Los procariotas más grandes y complejos son las **cianobacterias**, bacterias en las que evolucionó la fotosíntesis.

La estructura de célula procariota típica es la de ***Escherichia coli (E. coli)***, un habitante común del tracto intestinal humano (Fig. 1.6). La célula tiene forma de bastón, alrededor de 1 μm de diámetro y cerca de 2 μm de longitud. Como la mayoría de los otros procariotas, *E. coli* está rodeada por una **pared celular bacteriana** rígida compuesta de polisacáridos y péptidos. Dentro de la pared celular se encuentra la **membrana plasmática**, que es una bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas. Mientras que la pared celular es porosa y puede ser penetrada por una variedad de moléculas, la membrana plasmática proporciona una separación funcional entre el interior de la célula y su medio externo. El ADN de *E. coli* es una molécula circular única en el nucleoide, que, en comparación con el núcleo de los eucariotas, no está rodeado por una membrana que lo separe del citoplasma. El citoplasma contiene aproximadamente 30.000 **ribosomas** (lugar de la síntesis de proteínas), que destacan por su apariencia granular.

### *Células eucariotas*

Como las células procariotas, todas las células eucariotas están rodeadas por membranas plasmáticas y contienen ribosomas. No obstante, las células eucariotas son mucho más complejas y contienen un núcleo, variedad de orgánulos citoplasmáticos, y un citoesqueleto (Fig. 1.7). El orgánulo más grande y prominente de las células eucariotas es el **núcleo**, con un diámetro aproximado de 5 $\mu$m. El núcleo contiene la información genética de la célula, que en los eucariotas se encuentra organizada de forma linear en lugar de moléculas de ADN circular. El núcleo es el sitio de la replicación del ADN y de la síntesis del ARN; la traducción del ARN en proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma.

Además de un núcleo, las células eucariotas contienen una variedad de orgánulos delimitados por membranas dentro del citoplasma. Estos orgánulos proporcionan diferentes compartimentos en los que se localizan las distintas actividades metabólicas. Las células eucarióticas son por lo general más grandes que las células procariotas, con frecuencia presentando un volumen celular cien veces mayor. La compartimentalización proporcionada por los orgánulos citoplasmáticos es lo que permite a las células eucariotas funcionar con eficiencia. Dos de estos orgánulos, las **mitocondrias** y los **cloroplastos**, juegan papeles imprescindibles en el metabolismo energético. Las mitocondrias, que se encuentran en casi todas las células eucariotas, son los centros del metabolismo oxidativo y son por tanto las responsables de generar la mayoría del ATP derivado de la rotura de moléculas orgánicas. Los cloroplastos son los centros donde se lleva a cabo la fotosíntesis y se encuentran exclusivamente en las células de las plantas y algas verdes. Los **lisosomas** y los **peroxisomas** también proporcionan compartimentos metabólicos especializados para la digestión de macromoléculas y varias reacciones oxidativas, respectivamente. Además, la mayoría de las células de las plantas contienen grandes **vacuolas** que desarrollan variedad de funciones, incluyendo la digestión de macromoléculas y el almacenaje de productos de desecho y nutrientes.

Debido al tamaño y complejidad de las células eucariotas, el transporte de proteínas a sus destinos dentro de la célula es una labor formidable. Dos orgánulos citoplasmáticos, el **retículo endoplasmático** y el **aparato de Golgi**, están específicamente dedicados a la diferenciación y transporte de las proteínas destinadas a la secreción, a la incorporación en la membrana plasmática, y a la incorporación en los lisosomas. El retículo endoplasmático es una red extensa de membranas intracelulares, que se extienden desde la membrana nuclear hasta atravesar todo el citoplasma. No solo actúa en el proceso y transporte de proteínas, sino también en la síntesis de lípidos. Desde el retículo endoplasmático, las proteínas son transportadas dentro de pequeñas vesículas al aparato de Golgi, donde siguen siendo procesadas y clasificadas para el transporte a sus destinos finales. Además de esta función de transporte de proteínas, el aparato de Golgi presenta síntesis de lípidos y (en células de las plantas) síntesis de algunos polisacáridos que componen la pared celular.

Las células eucariotas tienen otro nivel de organización interna: el **citoesqueleto**, una red de filamentos proteínicos que se extienden por el citoplasma. El citoesqueleto proporciona el marco estructural de la célula, determinando la forma celular y la organización general del citoplasma. Además, el citoesqueleto es responsable de los movimientos de todas las células (por ej., la contracción de las células musculares), del transporte intracelular y la posición de los orgánulos y otras estructuras, incluyendo los movimientos de los cromosomas durante la división celular.

Los eucariotas se desarrollaron hace al menos 2.700 millones de años, después de 1.000 ó 1.500 millones de años de la evolución procariota. Los estudios de sus secuencias de ADN indican que las arquebacterias y eubacterias son tan diferentes entre sí como lo son de los eucariotas actuales. Por lo tanto, parece ser que un acontecimiento en la primera etapa de la evolución ha sido el motivo

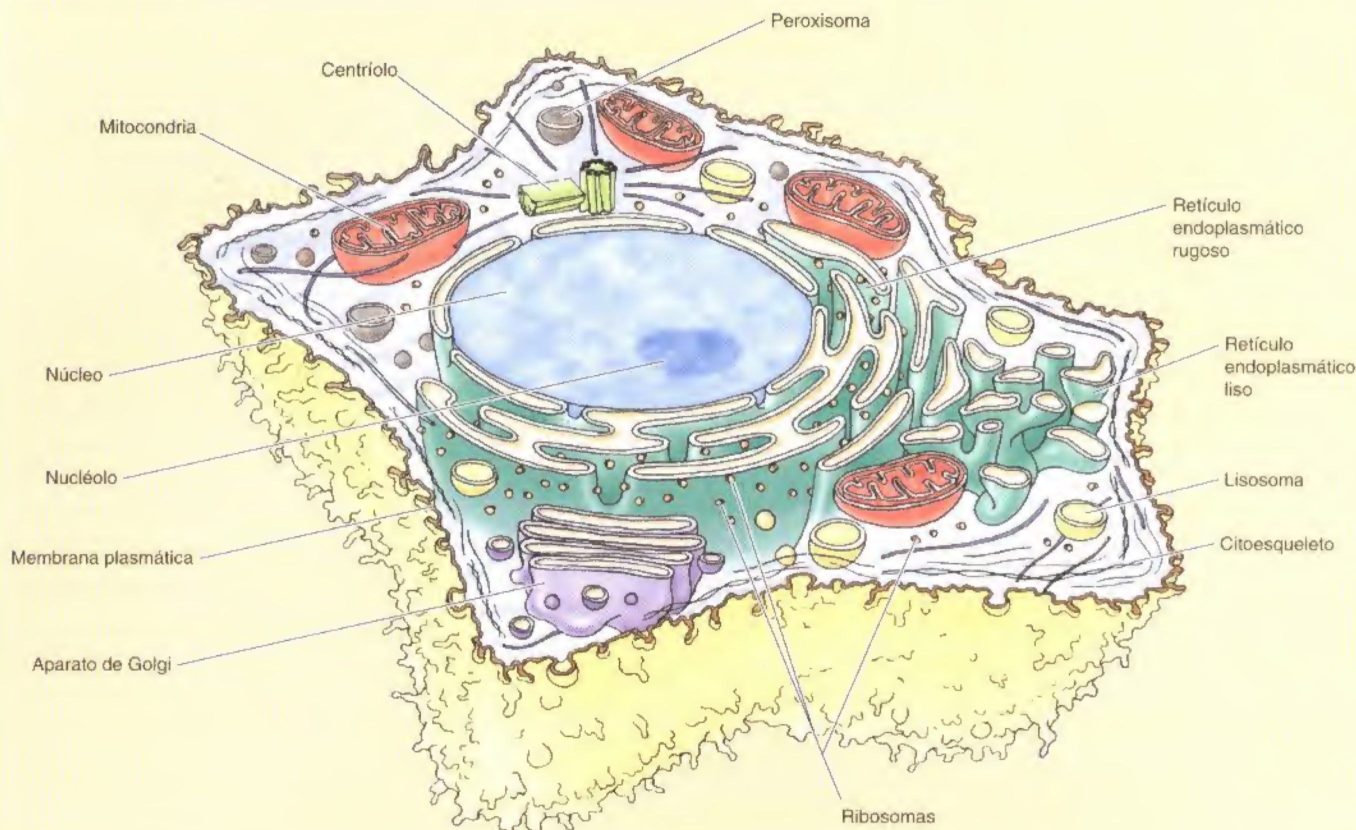



*Figura 1.7*
**Estructuras de las células animales y vegetales.** Las células animales y vegetales están rodeadas por una membrana plasmática y contienen un núcleo, un citoesqueleto, y muchos orgánulos citoplasmáticos en común. Las células vegetales también están rodeadas por una pared celular y contienen cloroplastos y vacuolas grandes.

de la divergencia de tres líneas de descendencia a partir de un antepasado común, dando lugar a las actuales arquebacterias, eubacterias, y eucariotas. Resulta interesante que muchos genes de las arquebacterias son más similares a los de los eucariotas que a los de las eubacterias, indicando que las arquebacterias y los eucariotas comparten una línea común de descendencia evolutiva y que están más estrechamente relacionados entre ellos que con las eubacterias (Fig. 1.8).

Un paso crítico en la evolución de las células eucariotas fue la adquisición de la envoltura membranosa de los orgánulos subcelulares, permitiendo el desarrollo de la complejidad característica de estas células. Estos orgánulos se cree que han sido adquiridos como resultado de la asociación de células procariotas con el antepasado de los eucariotas.

La hipótesis de que las células eucariotas evolucionaron a partir de una asociación simbiótica de las procariotas —**endosimbiosis**— se sustenta con los estudios de las mitocondrias y los cloroplastos, los cuales se cree que han evolucionado desde bacterias que vivían en células grandes. Las mitocondrias y los cloroplastos tienen un tamaño similar al de las bacterias, y como ellas, se reproducen mediante su escisión bipartita. Lo más importante, es que las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio ADN, que codifica algunos de sus componentes. El ADN de las mitocondrias y cloroplastos se replica cada vez que el orgánulo se divide, y los genes que contiene se transcriben dentro del orgánulo y se traducen en los ribosomas de este. Por lo tanto, las mitocondrias y los cloroplastos contienen sus propios sistemas genéticos, que son diferentes

**Célula vegetal**

Citoesqueleto
Mitocondria
Peroxisoma
Vacuola
Ribosoma
Cloroplastos
Retículo endoplasmático liso
Retículo endoplasmático rugoso
Nucléolo
Núcleo
Pared celular
Aparato de Golgi
Membrana plasmática

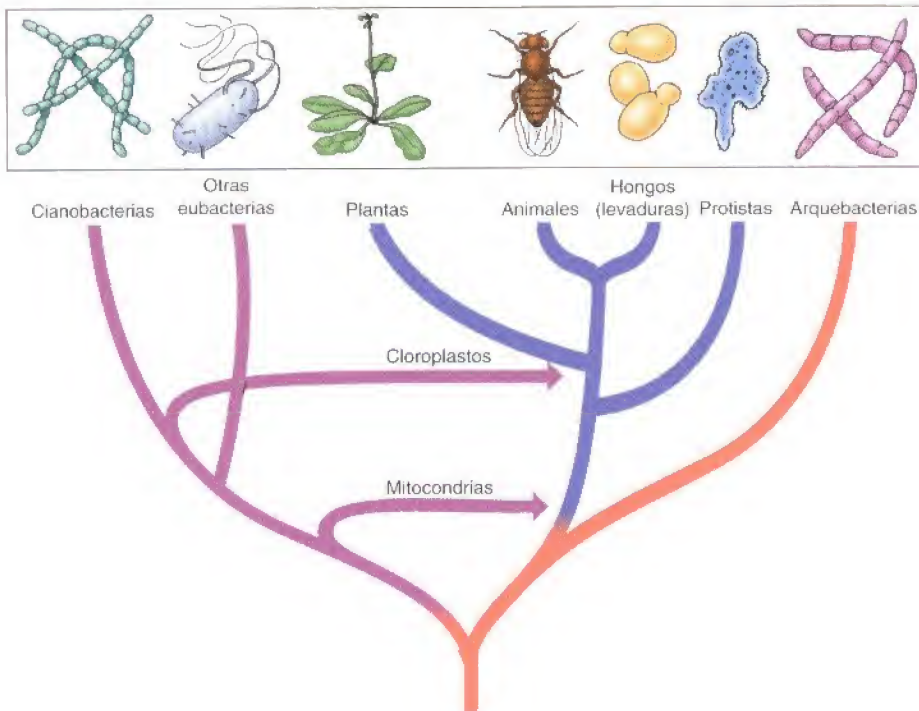



*Figura 1.8*
**Evolución de las células.** Las células actuales evolucionaron desde un antepasado procariota común a tres largas líneas de descendencia, dando lugar a las arqueobacterias, eubacterias, y eucariotas. Las mitocondrias y los cloroplastos tuvieron su origen en la asociación simbiótica entre las bacterias aerobias y las cianobacterias, respectivamente, con los ancestros de las eucariotas.

**TABLA 1.2.** Contenido de ADN en las células

| Organismo | Contenido de ADN haploide (millones de pares de bases) |
|---|---|
| **Bacterias** | |
| *Mycoplasma* | 0,6 |
| *E. coli* | 4,6 |
| **Eucariotas unicelulares** | |
| *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras) | 12 |
| *Dictyostelium discoideum* | 70 |
| *Euglena* | 3.000 |
| **Plantas** | |
| *Arabidopsis thaliana* | 125 |
| *Zea mais* (maíz) | 5.000 |
| **Animales** | |
| *Caenorhabditis elegans* (nematodo) | 97 |
| *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) | 180 |
| Pollo | 1.200 |
| Pez cebra | 1.700 |
| Ratón | 3.000 |
| Humano | 3.000 |




*Figura 1.9*
**Micrografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*.** Micografía con color artificial. (Andrew Syed Sciene Photo Library/Photo Researchers, Inc.)

del genoma nuclear de la célula. Además, los ribosomas y los ARN ribosómicos de estos orgánulos están más relacionados con los bacterianos que aquellos codificados por los genomas nucleares de los eucariotas.

En general, se ha aceptado un origen endosimbiótico de estos orgánulos, suponiendo que la mitocondria ha evolucionado a partir de las bacterias aerobias y los cloroplastos de las bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias. La adquisición de bacterias aerobias podría provenir de una célula aerobia con la habilidad de llevar a cabo un metabolismo oxidativo. La adquisición de bacterias fotosintéticas podría provenir de la independencia nutricional conseguida al desarrollar la fotosíntesis. Por tanto, estas asociaciones endosimbióticas resultaron muy beneficiosas para sus asociados, que fueron seleccionados en el curso de la evolución. A través del tiempo, la mayoría de los genes originalmente presentes en estas bacterias en apariencia pasaron a incorporarse dentro del genoma nuclear de la célula, así que solamente algunos componentes de las mitocondrias y cloroplastos siguen siendo codificados por los genomas de los orgánulos.

## *Desarrollo de organismos multicelulares*

Muchos eucariotas son organismos unicelulares que, como las bacterias, se componen de células únicas capaces de su propia replicación. Los eucariotas más simples son las **levaduras**. Las levaduras son más complejas que las bacterias, pero mucho más pequeñas y simples que las células animales o vegetales. Por ejemplo, la levadura hasta ahora más estudiada ***Saccharomyces cerevisiae*** tiene un diámetro aproximado de 6 μm y contiene 12 millones de pares de bases de ADN (Fig. 1.9). Sin embargo, otros eucariotas unicelulares son células mucho más complejas, algunas contienen tanto ADN como el que contienen las células humanas (Tabla 1.2). Estos incluyen organismos especializados para desarrollar gran variedad de funciones, incluyendo la fotosíntesis, el movimiento, y la captura e ingestión de otros organismos como alimento. La *Amoeba proteus*, por ejemplo, es una célula grande y compleja. Su volumen es 100.000 veces mayor que el de *E. coli*, y su longitud puede sobrepasar 1 mm cuando la célula está completamente extendida (Fig. 1.10). Las amebas son organismos muy móviles que utilizan extensiones citoplasmáticas, llamadas *pseudopodia* o **pseudópodos**, para moverse y envolver a otros organismos, incluyendo bacte-

*Figura 1.10*
**Micrografía óptica de *Amoeba proteus*.** (M. I. Walker/ Photo Researchers, Inc.)



rias y levaduras, como alimento. Otros eucariotas unicelulares (las algas verdes) contienen cloroplastos y son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis.

Los organismos multicelulares evolucionaron de los eucaritas unicelulares hace al menos 1.700 millones de años. Algunos eucariotas unicelulares forman agregados multicelulares que parecen representar una transición evolutiva desde una única célula a un organismo multicelular. Por ejemplo, las células de muchas algas (por ej., el alga verde *Volvox*) se asocian unas con otras para formar colonias multicelulares (Fig. 1.11), las cuales se cree que son los precursores evolutivos de las plantas actuales. El aumento de la especialización celular determinó la transición de las colonias agregadas a los verdaderos organismos multicelulares. La continua especialización y la división de las funciones entre las células de un organismo ha proporcionado la complejidad y diversidad observada en los muchos tipos de células que componen las plantas y animales de hoy, incluyendo a los seres humanos.

Las plantas se componen de menos tipos de células que los animales, pero cada tipo diferente de célula vegetal está especializada para desarrollar funciones específicas requeridas por el organismo en su conjunto (Fig. 1.12). Las células vegetales están organizadas en tres sistemas de tejidos principales: tejido basal, tejido dérmico, y tejido vascular. El tejido basal contiene a las **células del parénquima**, que lleva a cabo la mayoría de las reacciones metabólicas

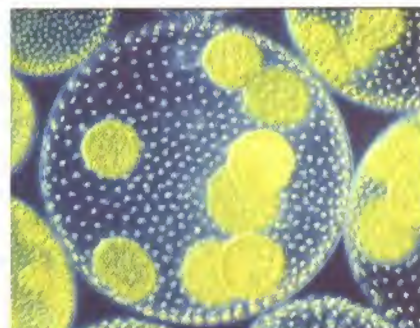
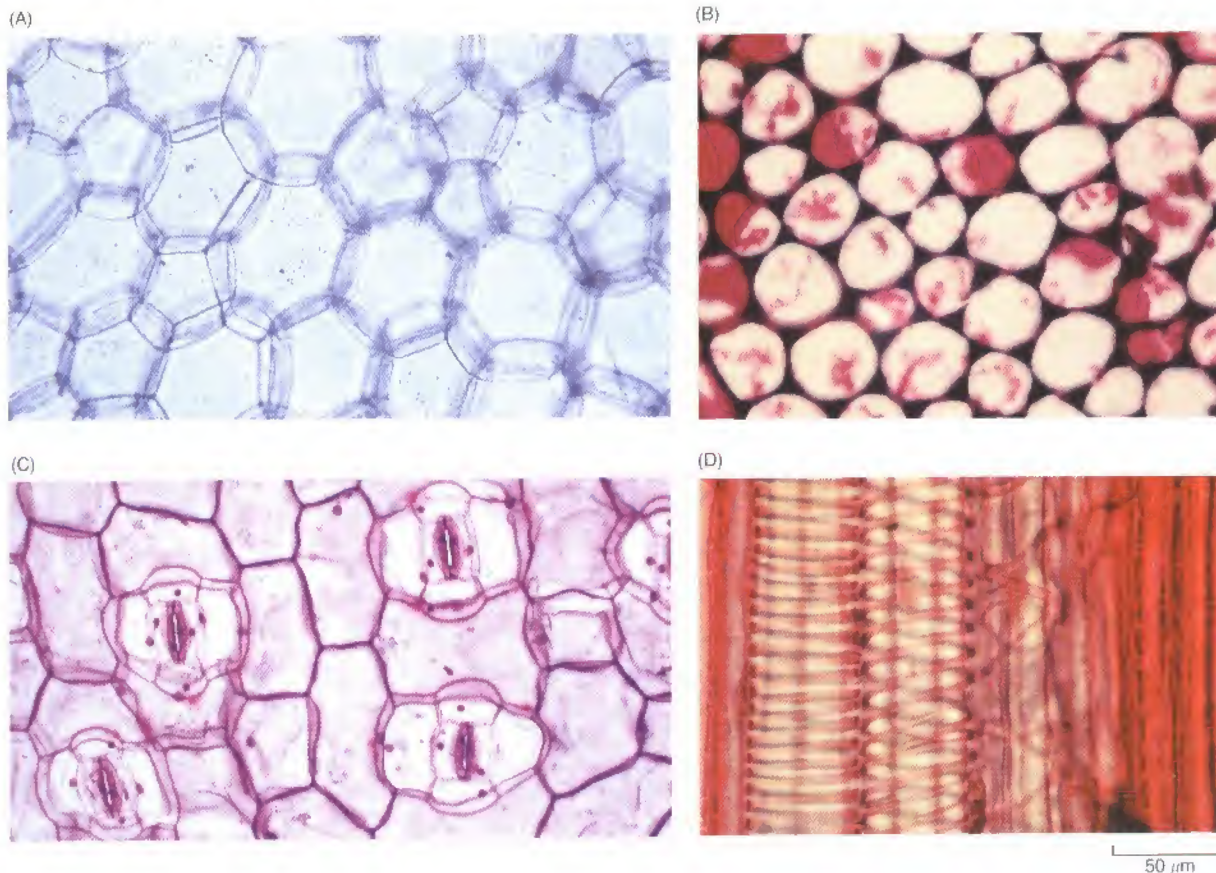


*Figura 1.11*
**Alga verde colonial.** Las células individuales de *Volvox* forman colonias que consisten en esferas huecas en las que están embebidas en una masa gelatinosa cientos o miles de células. (Cabisco/Visuals Unlimited.)

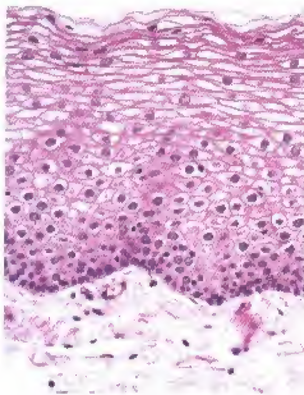
*Figura 1.12*
**Micrografías ópticas de células vegetales representativas.** (A) Células del parénquima, responsables de la fotosíntesis y de otras reacciones metabólicas. (B) Células del colénquima, especializadas para dar soporte y endurecer las paredes celulares. (C) Células epidérmicas en la superficie de una hoja. (D) Los elementos de los vasos y las traqueidas son células alargadas que se disponen enfrentadas para formar los vasos del xilema. (A, Jack M. Bastsack/Visuals Unlimited; B, A. J. Karpoff/Visuals Unlimited; C, Alfred Owczarzak/Biological Photo Service; D, Biophoto Associates/Science Source/Photo researchers Inc.)



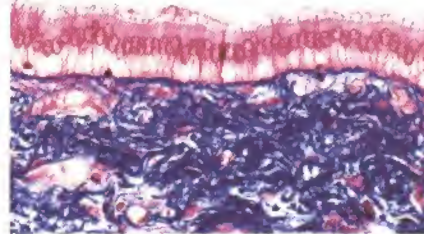
de la planta, incluyendo la fotosíntesis. El tejido basal también contiene dos tipos de células especializadas (**células del colénquima** y **células del esclerénquima**) que se caracterizan por paredes celulares gruesas y por proporcionar el soporte estructural de la planta. El tejido dérmico cubre la superficie de la planta y está compuesto por **células epidérmicas**, que forman un revestimiento de protección y permiten la absorción de nutrientes. Finalmente, el sistema vascular (el xilema y floema) está formado por diversos tipos de células alargadas, y es el responsable del transporte de agua y nutrientes a través de la planta.

Las células presentes en animales son considerablemente más diversas que las de las plantas. El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos de células diferentes, consideradas generalmente como componentes de los cinco tipos principales de tejidos: tejido epitelial, tejido conectivo, sangre, tejido nervioso, y tejido muscular (Fig. 1.13). Las **células epiteliales** forman láminas que cubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos in-

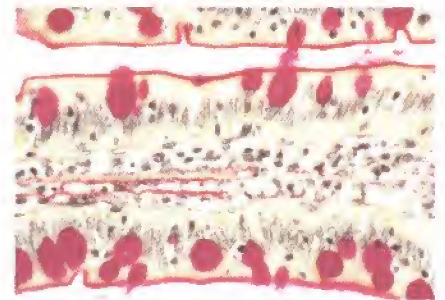
(A)i Boca



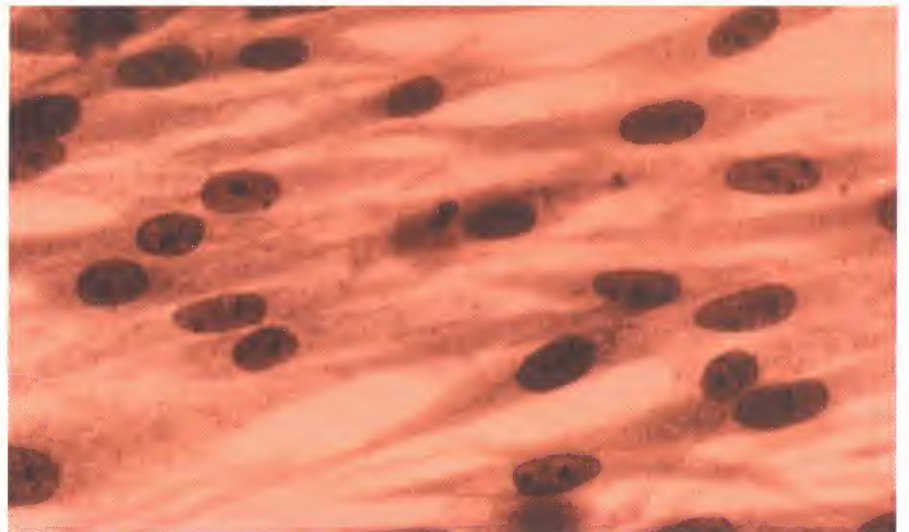
(A)ii Conducto biliar



(A)iii Intestino



(B)



(C)










*Figura 1.13*
**Micrografías ópticas de células animales representativas.** (A) Células epiteliales de la boca (una lámina multiestratificada gruesa), conducto biliar, e intestino. (B) Los fibroblastos son células del tejido conectivo caracterizadas por su forma de huso alargado. (C) Eritrocitos, granulocitos, linfocitos, y monocitos en sangre humana. [(A)i y (A)ii, G. W. Willis/biological Photo Service; (A)iii, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.; B, Don W. Fawcett/Visuals Unlimited; C, G. W. Willis/ Biological Photo Service.]

ternos. Existen muchos tipos diferentes de células epiteliales, cada una especializada para una función específica, incluyendo protección (la piel), absorción (por ej., las células del intestino delgado), y secreción (por ej., células de la glándula salivar). El tejido conectivo incluye hueso, cartílago y tejido adiposo, cada uno de los cuales está formado por diferentes tipos de células (osteoblastos, condrocitos, y adipocitos, respectivamente). El tejido conectivo suelto que delimita con las capas epiteliales y rellena los espacios entre los órganos y tejidos del cuerpo está formado por otra tipo de células, los **fibroblastos**. La sangre contiene diferentes tipos de células, que funcionan en el transporte del oxigeno (glóbulos rojos, o **eritrocitos**), reacciones inflamatorias (**granulocitos**, **monocitos**, y **macrófagos**), y la respuesta inmune (**linfocitos**). El tejido nervioso está formado por células nerviosas, o **neuronas**, que están altamente especializadas en la trasmisión de señales a través del cuerpo. Varios tipos de células sensoriales, como las células del ojo y el oído, están aún más especializadas en la recepción de señales del ambiente. Finalmente, diferentes tipos de células musculares son responsables de la producción de fuerza y movimiento. La evolución de los animales claramente implica el desarrollo de una diversidad y especialización considerable a nivel celular. Entender los mecanismos que controlan el crecimiento y diferenciación de estas células tan complejas y especializadas, desde la fertilización de un solo huevo, es uno de los mayores desafíos de la biología celular y molecular contemporánea.

## Células como modelos experimentales

La evolución de las células actuales a partir de su antepasado común tiene importantes implicaciones para la biología celular y molecular como ciencia experimental. Debido a que las propiedades fundamentales de todas las células se han conservado durante la evolución, los principios básicos obtenidos de los experimentos desarrollados con un solo tipo de célula son generalmente aplicables a otras células. Por otra parte, debido a la diversidad de las células actuales, muchos de los experimentos son más fáciles de llevar acabo con un tipo de células en lugar de otras. Se utilizan diferentes tipos de células y organismos como modelos experimentales para estudiar diversos aspectos de la biología celular y molecular. Las características de algunas de estas células que resultan particularmente ventajosas como modelos experimentales se discuten en las siguientes secciones.

### *E. coli*

Debido a la simplicidad de su comparativa, las células procariotas (bacterias) son los modelos ideales para el estudio de los aspectos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica. La especie de bacterias mejor estudiada es *E. coli*, que ha sido el organismo por excelencia en la investigación de los mecanismos básicos de la genética molecular. La mayoría de los conceptos actuales de la biología molecular —incluyendo nuestra comprensión sobre la replicación del ADN, el código genético, la expresión génica y la síntesis de proteínas— derivan de los estudios sobre esta humilde bacteria.

*E. coli* ha resultado especialmente útil para los biólogos moleculares debido a su relativa simplicidad y la facilidad para propagarse y ser estudiada en el laboratorio. El genoma de *E. coli*, por ejemplo, consiste en aproximadamente 4,6 millones de pares de bases y contiene aproximadamente unos 4.000 genes. El genoma humano es casi mil veces mayor (aproximadamente 3 billones de pares de bases) y se cree que contiene 30-40.000 genes (véase Tabla 1.2). El tamaño pequeño del genoma de *E. coli* (que se secuenció por completo en 1997) proporciona claras ventajas para el análisis genético.

Los experimentos genéticos moleculares se ven facilitados por el rápido crecimiento de *E. coli* bajo condiciones de laboratorio predeterminadas. Bajo condiciones óptimas de cultivo, *E. coli* se divide cada 20 minutos. Además, una población



*Figura 1.14*
**Colonias de bacterias.** Fotografía de colonias de *E. coli* creciendo en la superficie de un medio de agar. (A. M. Siegelman/Visuals Unlimited.)

clónica de *E. coli*, en la que todas las células se derivan de la división de una única célula original, se puede aislar fácilmente como una colonia en crecimiento en un medio que contenga agar semisólido (Fig. 1.14). Debido a que las colonias bacterianas que contienen más de $10^8$ células se pueden desarrollar en una noche, la selección de variantes genéticas de una cepa de *E. coli* —por ejemplo, mutantes que son resistentes a un antibiótico, como la penicilina— es fácil y rápida. La facilidad con la que estos mutantes pueden ser seleccionados y analizados resultó clave para el éxito de los experimentos que definen los principios básicos de la genética molecular, discutidos en el Capítulo 3.

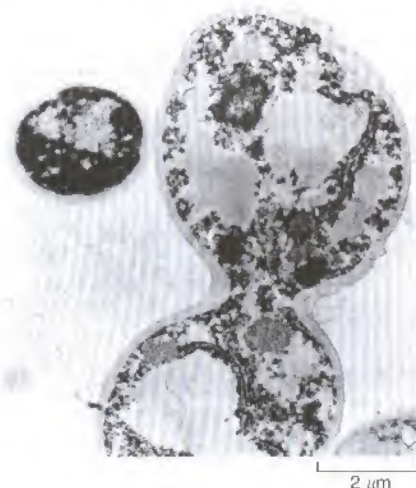
Las mezclas nutritivas en las que *E. coli* se divide más rápidamente incluyen glucosa, sales, y varios compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, vitaminas, y precursores de ácidos nucleicos. No obstante, *E. coli* también puede crecer en un medio mucho más simple que contenga solamente sales, una fuente de nitrógeno (como el amoníaco), y una fuente de carbón y energía (como la glucosa). En este medio, la bacteria crece un poco más lenta (con un tiempo de división de unos 40 minutos) ya que tiene que sintetizar todos sus aminoácidos, nucleótidos, y otros compuestos orgánicos. La habilidad de *E. coli* para llevar a cabo estas reacciones biosintéticas en un medio simple ha hecho que sea extremadamente útil para el descubrimiento de los procesos bioquímicos implicados. Por tanto, el rápido crecimiento y los simples requisitos nutricionales de *E. coli* han facilitado los experimentos fundamentales de la biología molecular y la bioquímica.

## *Levaduras*

Aunque las bacterias han sido un modelo de valor incalculable para el estudio de muchas de las propiedades conservadas de las células, éstas obviamente no pueden ser utilizadas para estudiar aspectos de la estructura y función celulares que son únicos de eucariotas. Las levaduras, los eucariotas más simples, aportan numerosas ventajas experimentales similares a las de *E. coli*. En consecuencia, las levaduras han proporcionado un modelo crucial para el estudio de muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular eucariota.

El genoma de la levadura que con más frecuencia se ha estudiado, *Saccharomyces cerevisiae*, consiste en 12 millones de pares de bases de ADN y contiene alrededor de 6.000 genes. Aunque el genoma de las levaduras es aproximadamente tres veces mayor que el de *E. coli*, resulta más manejable que los genomas de eucariotas más complejos, como el de los humanos. Incluso en su simplicidad, la célula de levadura exhibe las características típicas de las células eucariotas (Fig. 1.15): Contiene un núcleo distinto rodeado por una membrana nuclear, su ADN genómico esta organizado en 16 cromosomas lineales, y su citoplasma contiene un citoesqueleto y orgánulos subcelulares.

*Figura 1.15*
**Micrografía electrónica de *Saccharomyces cerevisiae*.** (David Scharf/Peter Arnold, Inc.)




Las levaduras pueden crecer con facilidad en el laboratorio y pueden ser estudiadas bajo muchos de los mismos protocolos genéticos moleculares que han resultado satisfactorios con *E. coli*. Aunque las levaduras no se replican tan rápido como las bacterias, se dividen cada 2 horas y pueden crecer fácilmente dando lugar a colonias a partir de una sola célula. Las levaduras se pueden utilizar en variedad de manipulaciones genéticas similares a aquellas que se pueden realizar utilizando bacterias.

Estas características han hecho a las levaduras las células eucariotas más accesibles desde el punto de vista de la biología molecular. Las levaduras mutantes han resultado importantes para la comprensión de muchos procesos fundamentales en eucariotas, incluyendo la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN, ensamblaje de proteínas, y la regulación de la división celular, tal y como discutiremos en capítulos siguientes. La unidad de la biología celular molecular se presenta clara debido al hecho de que los principios generales de la estructura y función celulares revelados por los estudios de las levaduras se pueden aplicar a todas las células eucariotas.

## *Dictyostelium discoideum*

**Dictyostelium discoideum** es un moho celular del lodo, el cual, como las levaduras, es un eucariota unicelular comparativamente simple. El genoma de *Dictyostelium* es aproximadamente diez veces mayor que el de *E. coli* —más complejo que el genoma de las levaduras pero considerablemente más simple que los genomas de los eucariotas superiores—. Además, *Dictyostelium* puede crecer con facilidad en el laboratorio y resulta susceptible a una variedad de manipulaciones genéticas.

Bajo condiciones nutritivas abundantes, *Dictyostelium* vive como una ameba de una única célula, que se alimenta de bacterias y levaduras. Es una célula móvil, y esta propiedad ha hecho que *Dictyostelium* sea un modelo importante para el estudio de los mecanismos moleculares responsables de los movimientos de las células animales (Fig. 1.16). Por ejemplo, la introducción de mutaciones apropiadas en *Dictyostelium* ha revelado las funciones de varios genes implicados en la movilidad celular.

Otra de las características interesantes de *Dictyostelium* es la habilidad de las células únicas para agregarse formando estructuras multicelulares. Si el suplemento adecuado de comida no está disponible, las células se asocian para formar estructuras parecidas a lombrices llamadas babosas, cada una de ellas constituida por más de 100.000 células que funcionan como una unidad. *Dictyostelium* se sitúa por tanto en la frontera entre los organismos unicelulares y multicelulares, proporcionando un modelo importante para los estudios de señalización celular e interacciones célula-célula.

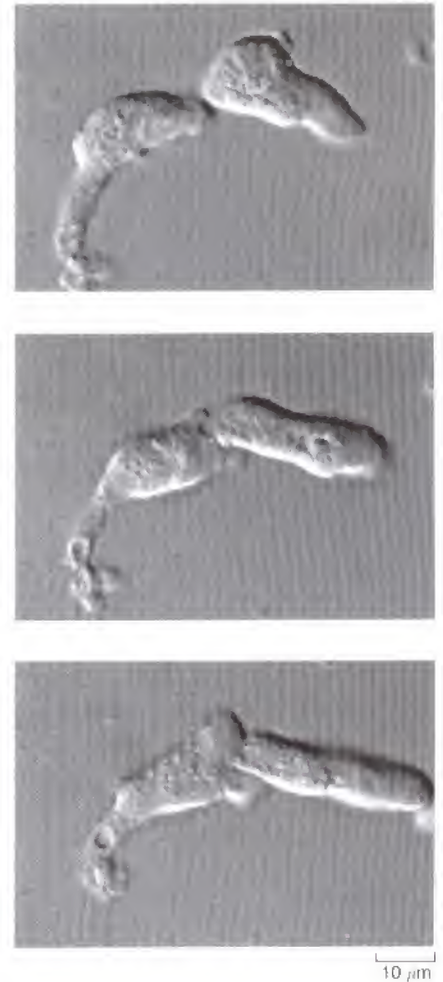



*Figura 1.16*
**Dyctiostelium discoideum.** Estas fotografías muestran el movimiento de dos amebas durante 40 segundos. (Cortesía de David Knecht, University of Connecticut.)

## *Caenorhabditis elegans*

Los eucariotas unicelulares *Saccharomyces* y *Dictyostelium* son modelos importantes para el estudio de las células eucariotas, pero entender el desarrollo de los organismos multicelulares requiere los análisis experimentales de plantas y animales, organismos que son mucho más complejos. El nemátodo **Caenorhabditis elegans** (Fig. 1.17) posee diversas características notables que hacen que sea uno de los modelos más utilizados en los estudios de desarrollo animal y diferenciación celular.

Aunque el genoma de *C. elegans* (aproximadamente 100 millones de pares de bases) es mayor que los eucariotas unicelulares, es más simple y más manejable que los genomas de la mayoría de los animales. Su secuencia ha sido determinada por completo, revelando que el genoma de *C. elegans* contiene aproximadamente 19.000 genes —alrededor de tres veces más que el número de genes de levaduras, y un quinto del número de genes previsibles en humanos—. Biológicamente, *C. elegans* es también un organismo multicelular relativamente simple: Las lombrices adultas solamente se componen de 959 **células somáticas**, y de 1.000 a 2.000 **células germinales**. Además, *C. elegans* puede ser reproducida con facilidad y ser sometida a manipulaciones genéticas en el laboratorio.

La simplicidad de *C. elegans* ha permitido que el curso de su desarrollo se haya estudiado en detalle mediante observación microscópica. Estos análisis

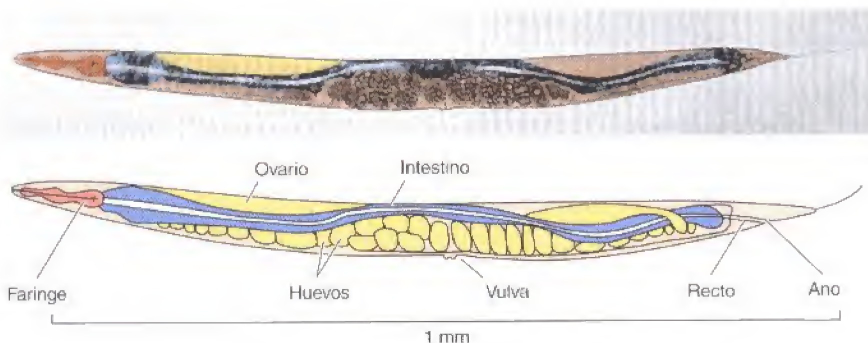



*Figura 1.17*
**Caenorhabditis elegans.** (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, 1977. *Dev. Biol.* 56: 110.)



*Figura 1.18*
***Drosophila melanogaster.*** (Darwin Dale/ Photo Researchers, Inc.)

han trazado satisfactoriamente el origen embrionario y el linaje de todas las células en la lombriz adulta. Los estudios genéticos también han identificado algunas de las mutaciones responsables de anormalidades del desarrollo, conduciendo al aislamiento y descripción de genes claves que controlan el desarrollo y diferenciación del nemátodo. Cabe destacar que se han encontrado similares genes que funcionan en animales complejos (incluyendo humanos), resultando *C. elegans* un importante modelo para los estudios del desarrollo animal.

## *Drosophila melanogaster*

Al igual que *C. elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Fig. 1.18) ha sido un modelo de organismo crucial en la biología del desarrollo. El genoma de *Drosophila* es similar al tamaño del genoma de *C. elegans*, pudiéndose mantener y reproducir fácilmente en el laboratorio. Además, el corto ciclo de reproducción de *Drosophila* (unas 2 semanas) la convierte en un organismo muy útil para los experimentos genéticos. Muchos conceptos fundamentales de la genética —como la relación entre genes y cromosomas— se derivaron de los estudios en *Drosophila* a principios del siglo veinte (véase el Cap. 3).

Los exhaustivos análisis genéticos en *Drosophila* han descubierto muchos de los genes que controlan el desarrollo y la diferenciación, siendo los métodos actuales de la biología molecular los que han permitido el análisis en detalle de las funciones de estos genes. Como consecuencia, los estudios de *Drosophila* han permitido avanzar en el entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo animal, particularmente respecto a la formación del cuerpo de organismos multicelulares complejos. Al igual que *C. elegans*, en vertebrados existen genes y mecanismos similares, validando el uso de *Drosophila* como uno de los modelos experimentales más importantes de la biología contemporánea del desarrollo.

## *Arabidopsis thaliana*

*Figura 1.19*
***Arabidopsis thaliana.*** (Jeremy Burgess/ Photo Researchers, Inc.)



El estudio del desarrollo y la biología molecular vegetal es un campo activo y en expansión de considerable importancia económica al igual que de interés intelectual. Desde que los genomas de las plantas cubren una dimensión de complejidad comparable a los genomas animales (véase la Tabla 1.2), un modelo óptimo para el estudio del desarrollo vegetal sería un organismo relativamente simple que poseyera alguna de las ventajas de *C. elegans* y *Drosophila*. La pequeña planta con flor ***Arabidopsis thaliana*** (Fig. 1.19) recoge estos criterios, por lo que se utiliza como modelo para el estudio de la biología molecular en plantas.

*Arabidopsis* resulta notable por su genoma de tan sólo unos 120 millones de pares de bases que contiene aproximadamente 15.000 genes diferentes —una complejidad similar a la de *C. elegans* y *Drosophila*. Además, la *Arabidopsis* es fácil de cultivar en el laboratorio, y ya se han desarrollado métodos para su manipulación genética molecular. Estos estudios han llevado a la identificación de genes implicados en varios aspectos del desarrollo vegetal, como es el desarrollo de las flores. El análisis de estos genes indica la existencia de numerosas similitudes, pero también diferencias notables, entre los mecanismos que controlan el desarrollo de vegetales y animales.

## *Vertebrados*

Los animales más complejos son los vertebrados, incluyendo a los humanos y otros mamíferos. El genoma humano se compone aproximadamente de 3 billones de pares de bases —alrededor de 30 veces más que los genomas de *C. elegans*, *Drosophila*, o *Arabidopsis*— y contiene 30-40.000 genes. Además, el cuerpo humano se compone de más de 200 clases diferentes de tipos de células especializadas. Esta complejidad hace que los vertebrados sean difíciles de estudiar desde el punto de vista de la biología celular y molecular, aunque la mayoría del interés de las ciencias biológicas nace del deseo de entender el organismo humano. Además, entender muchas de las cuestiones sobre la importancia de la práctica inmediata

(por ej., en medicina) deben estar basadas en estudios de células humanas (o estrechamente relacionadas).

Un avance importante en el estudio de células humanas y de los mamíferos es el crecimiento de células aisladas en cultivo, donde pueden ser manipuladas bajo condiciones de laboratorio controladas. El uso de células cultivadas ha permitido realizar estudios sobre diversos aspectos de la biología celular de los mamíferos, incluyendo experimentos que han iluminado los mecanismos de la replicación del ADN, expresión génica, síntesis y procesamiento de proteínas, y división celular. Además, la habilidad de cultivar células en un medio químico definido ha permitido realizar estudios sobre los mecanismos de señales que normalmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular en el organismo intacto.

Las propiedades especializadas de algunos tipos de células altamente diferenciadas han hecho de ellas importantes modelos para el estudio de aspectos determinados de la biología celular. Las células musculares, por ejemplo, están altamente especializadas para realizar la contracción, produciendo fuerza y movimiento. Debido a esta especialización, las células musculares son un modelo crucial para el estudio del movimiento celular a nivel molecular. Otro ejemplo lo proporciona las células nerviosas (neuronas), que están especializadas en la conducción de señales electroquímicas a larga distancia. En humanos, los axones de las células nerviosas pueden tener más de un metro de largo, y algunos invertebrados, como el calamar, tienen neuronas gigantes con axones de hasta 1 mm de diámetro. Debido a su estructura y función tan especializadas, estas neuronas gigantes han sido importantes modelos en el estudio del transporte de iones a través de la membrana, y del papel del citoesqueleto en el transporte de orgánulos citoplasmáticos.




*Figura 1.20*
**Huevos de la rana *Xenopus laevis*.** (Cortesía de Michael Danilchik y Kimberly Ray.)

La rana ***Xenopus laevis*** es un modelo importante para los estudios del desarrollo temprano de los vertebrados. Los huevos de *Xenopus* son normalmente grandes células, con un diámetro aproximado de 1 mm (Fig. 1.20). Debido a que estos huevos se desarrollan fuera de la madre, todas las etapas del desarrollo desde el huevo hasta el renacuajo se pueden estudiar con facilidad en el laboratorio. Además, los huevos de *Xenopus* se pueden obtener en grandes cantidades, facilitando el análisis bioquímico. Gracias a estos avances técnicos, se ha utilizado *Xenopus* ampliamente en estudios sobre el desarrollo biológico y ha proporcionado importantes descubrimientos en los mecanismos que controlan el desarrollo, diferenciación, y división celular del embrión.

El **pez cebra** (Fig. 1.21) posee numerosas ventajas para los estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados. Este pequeño pez es fácil de mantener en

(A)


*Figura 1.21*
**Pez cebra.** (A) Embrión de 24 horas. (B) Pez adulto. (A, cortesía de Charles Kimmel, University of Oregon; B, cortesía de S. Kondo).

(B)




*Figura 1.22*
**El ratón como modelo del desarrollo humano.** Niño y ratón muestran defectos similares en la pigmentación (piebaldismo) como resultado de mutaciones en un gen necesario para la migración normal de los melanocitos (células responsables de la pigmentación de la piel) durante el desarrollo embrionario. (Cortesía de R. A. Fleischman, Markey cancer Center, University of Kentucky.)

el laboratorio y se reproduce con rapidez. Además, los embriones se desarrollan fuera de la madre y son transparentes, por lo que las primeras etapas del desarrollo pueden ser observadas con claridad. Se han desarrollado métodos poderosos para facilitar el aislamiento de las mutaciones que afectan al desarrollo del pez cebra, consiguiendo la identificación de varios cientos de estas mutaciones. Ya que el pez cebra es un vertebrado de fácil estudio, promete ser el puente entre los humanos y los sistemas más simples de invertebrados, como *C. elegans* y *Drosophila*.

Entre los mamíferos, el ratón es el más manejable para los análisis genéticos, lo cual se facilitará con la reciente finalización de la secuenciación del genoma del ratón. Aunque las dificultades técnicas de estudio de la genética del ratón (comparada, por ejemplo, a la genética de las levaduras o *Drosophila*) son inmensas, se han identificado varias mutaciones que afectan al desarrollo del ratón. Más importantes aún son, los recientes avances en la biología molecular que han permitido la producción de ratones transgénicos, en los que se han introducido genes mutantes específicos en la línea germinal del ratón, por lo que sus efectos en el desarrollo u otros aspectos de la función celular pueden ser estudiados en el contexto del animal completo. La manejabilidad del ratón como modelo del desarrollo humano se corresponde con el hecho de que las mutaciones en genes homólogos dan lugar a defectos del desarrollo similares en ambas especies; el piebaldismo es un ejemplo claro (Fig. 1.22).

## Instrumentos de la biología celular

Como en todas las ciencias experimentales, la investigación en biología celular depende de los métodos de laboratorio que se puedan utilizar para estudiar la estructura y función celulares. Muchos avances importantes sobre el funcionamiento de las células han conducido directamente al desarrollo de nuevos métodos de investigación. La apreciación de los instrumentos experimentales disponibles para el biólogo celular resulta por tanto crítica para entender el estado actual y futuro de las direcciones de este área de la ciencia que se mueve con tanta rapidez. Algunos de los métodos generales importantes de la biología celular están descritos en secciones siguientes. Otros avances experimentales, que incluyen los métodos de la bioquímica y de la biologia molecular, se discutirán en capítulos posteriores.

### *Microscopía óptica*

Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista, el estudio de las células ha dependido primordialmente del uso del microscopio. Es más, el descubrimiento real de las células surgió del desarrollo del microscopio: Robert Hooke fue el primero que acuñó el término de «célula» siguiendo sus observaciones de una pieza de corcho con un simple microscopio óptico en 1665 (Fig. 1.23). Utilizando un microscopio que ampliaba los objetos hasta 300 veces su tamaño real, Antony van Leeuwenhoek, en 1670 y años posteriores, fue capaz de observar diferentes tipos de células, incluyendo esperma, glóbulos rojos, y bacterias. La propuesta de la teoría celular planteada por Matthias Schleiden y Theodor Schwann en 1838 debe tomarse como el nacimiento de la biología celular contemporánea. Los estudios microscópicos de tejido vegetal por Schleiden y los de tejido animal por Schwann condujeron a la misma conclusión: Todos los organismos están compuestos por células. Más tarde, se reconoció que las células no se forman *de novo* sino que emergen únicamente por la división de las células preexistentes. Por tanto, la célula consiguió su actual reconocimiento como la unidad fundamental de todos los organismos vivos debido a las observaciones realizadas con el microscopio óptico.

El microscopio óptico continúa siendo un instrumento básico para los biólogos celulares, que con mejoras técnicas permiten la visualización de los detalles aumentados de la estructura celular. Los microscopios ópticos contemporáneos son capaces de aumentar los objetos hasta unas mil veces. Dado que la mayoría de las células se encuentran entre 1 y 100 μm de diámetro, pueden ser observadas en el microscopio óptico, como pueden ser también algunos de los orgánulos subcelulares, como el núcleo, los cloroplastos, y las mitocondrias. Sin embargo, el microscopio óptico no es lo suficientemente poderoso para observar pequeños detalles de la estructura celular, cuya **resolución** —la capacidad de un microscopio para distinguir objetos separados por pequeñas distancias— es mucho más importante que el aumento. Las imágenes se pueden aumentar tanto como se desee (por ejemplo, mediante la proyección en una pantalla grande), pero tal aumento no incrementa el nivel de detalle que se puede observar.

El límite de resolución del microscopio óptico es aproximadamente de 0,2 μm; dos objetos separados por menos de esta distancia aparecen como una única imagen, en lugar de distinguirse una de otra. Esta limitación teórica de la mi-



*Figura 1.23*
**Estructura celular del corcho.** Una reproducción de un dibujo de Robert Hooke de una lámina de corcho examinada con un microscopio óptico. Las «células» que Hooke observó fueron en realidad las paredes celulares que quedan cuando las células han muerto hace tiempo.

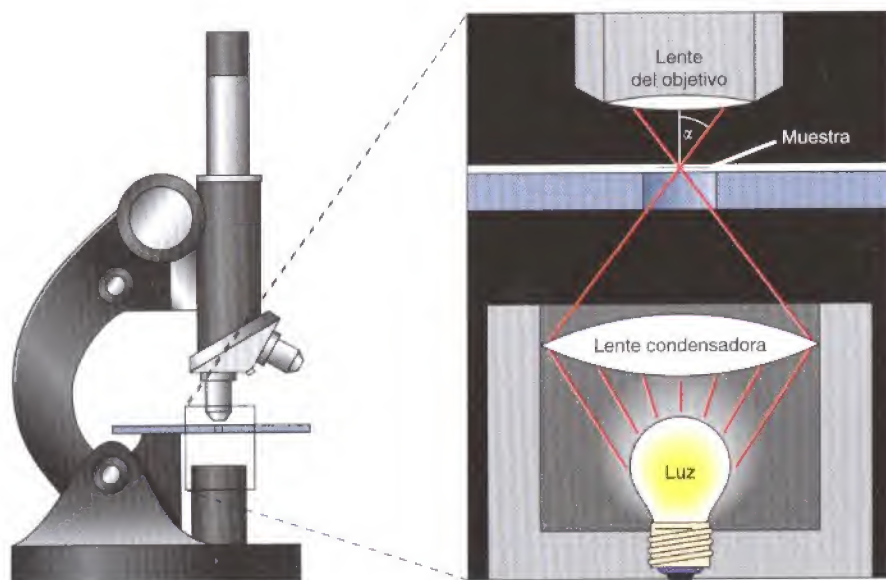



*Figura 1.24*
**Apertura numérica.** La luz se enfoca en la muestra mediante la lente condensadora y se recoge en la lente del objetivo del microscopio. La apertura numérica esta determinada por el ángulo del cono de la luz que entra en el objetivo de la lente (α) y por el índice de refracción del medio (normalmente agua o aceite) entre la lente y la muestra.

croscopía óptica está determinada por dos factores —la longitud de onda ($\lambda$) de la luz visible y el poder de captación de luz de las lentes del microscopio (apertura numérica, *AN*) —de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61\ \lambda}{AN}$$

La longitud de onda de la luz visible es de 0,4 a 0,7 $\mu$m, por lo que el valor de $\lambda$ se calcula en 0,5 $\mu$m para el microscopio óptico. La apertura numérica puede preverse como el tamaño del cono de luz que entra en la lente del microscopio después de pasar a través de la muestra (Fig. 1.24). Esto se obtiene de la ecuación

$$AN = \eta \text{ sen } \alpha$$

donde $\eta$ es el índice de refracción del medio a través del cual la luz viaja entre la muestra y la lente. El valor de $\eta$ para el aire es de 1,0, pero puede aumentar hasta un máximo aproximado de 1,4 utilizando una lente inmersa en aceite para ver la muestra a través de una gota de aceite. El ángulo $\alpha$ corresponde a la mitad de la anchura del cono de luz recogido por la lente. El valor máximo de $\alpha$ es de 90°, en el que el sen $\alpha = 1$, por lo que el valor más alto de la apertura numérica es de 1,4.

El límite teórico de resolución del microscopio óptico se puede por tanto calcular de la siguiente forma:

$$\text{Resolución} = \frac{0{,}61 \times 0{,}5}{1{,}4} = 0{,}22\ \mu\text{m}$$

Los microscopios capaces de llegar a este nivel de resolución se consiguieron fabricar a finales del siglo diecinueve; no se pueden esperar en estos aspectos nuevas mejoras de la microscopía óptica.

Rutinariamente se utilizan diferentes tipos de microscopía óptica para estudiar varios aspectos de la estructura celular. El más simple es el **microscopio de campo luminoso**, en el que la luz pasa directamente a través de la célula y en el que la habilidad para distinguir las diferentes partes de la célula depende del contraste que se obtiene de la absorción de la luz visible por los componentes celulares. En muchos casos, las células se tiñen con tintes que reaccionan con proteínas y ácidos nucleicos para resaltar el contraste entre las diferentes partes de la célula. Antes de teñir, las muestras son normalmente tratadas con fijadores (como el alcohol, ácido acético, o formaldehído) para estabilizar y conservar sus estructuras. El examen de los tejidos fijados y teñidos mediante el microscopio

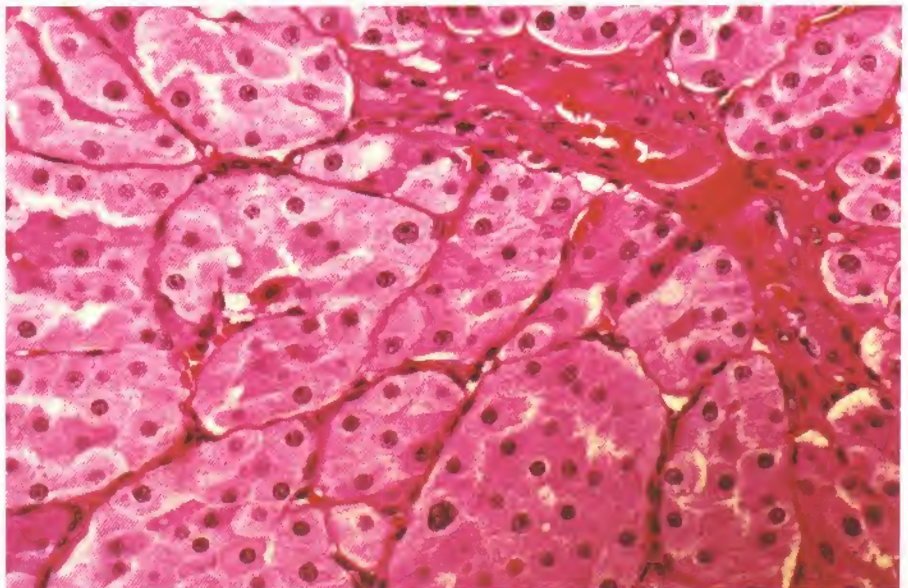


*Figura 1.25*
**Micrografía de campo luminoso de tejido teñido.** Sección de un tumor renal benigno. (G. W. Willis/Servicio de Fotografía Biológica.)

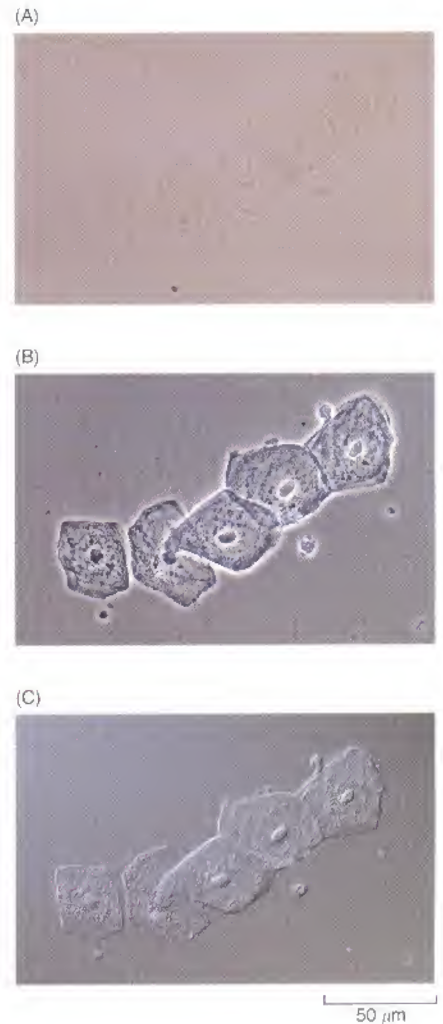



*Figura 1.26*
**Observación microscópica de células vivas.** Microfotografías de células bucales humanas obtenidas con (A) campo luminoso, (B) contraste de fases, (C) microscopía de interferencia-contraste diferencial. (Cortesía de Mort Abramowitz, Olympus america, Inc.)

de campo luminoso es la práctica estándar para analizar las muestras de tejidos en los laboratorios histológicos (Fig. 1.25). Tales procedimientos de tinción matan a las células, no obstante, y por tanto no resultan apropiados para muchos experimentos en donde se desea una observación de células vivas.

Sin la tinción, el paso directo de la luz no proporciona el contraste suficiente para distinguir muchas de las partes de la célula, limitando la utilidad del microscopio de campo luminoso. No obstante, las variaciones ópticas del microscopio óptico se pueden utilizar para potenciar el contraste entre las ondas de luz que pasan a través de regiones de la célula con diferentes densidades. Los dos métodos más comunes para la visualización de células vivas son la **microscopía de contraste de fases** y la **microscopía de interferencia-contraste diferencial** (Fig. 1.26). Los dos tipos de microscopía utilizan sistemas ópticos que convierten las variaciones de densidad o grosor entre las diferentes partes de la célula en diferencias de contraste que se pueden apreciar en la imagen final. En la microscopía de campo luminoso, las estructuras transparentes (como el núcleo) presentan poco contraste porque absorben pobremente la luz. Sin embargo, la luz disminuye cuando pasa a través de estas estructuras por lo que su fase se altera en comparación a la luz que ha pasado a través del citoplasma que las rodea. Las microscopías de contraste de fases y de interferencia-contraste diferencial convierten estas diferencias de fase en diferencias de contraste, mejorando de ese modo las imágenes de las células vivas sin teñir.

El poder del microscopio óptico se ha extendido mediante el uso de cámaras de vídeo y ordenadores para el análisis y procesamiento de imágenes. Tales sistemas de procesamiento de imágenes pueden potenciar sustancialmente el contraste de las imágenes obtenidas con el microscopio óptico, permitiendo la visualización de objetos pequeños que de otra forma no hubieran podido ser detectados. Por ejemplo, la **microscopía de interferencia-contraste diferencial video potenciada** ha permitido la visualización del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, que son filamentos de proteínas citoesqueléticas con un diámetros de tan solo 0,025 μm (Fig. 1.27). Sin embargo, esta potenciación no consigue llegar al límite teórico de resolución del microscopio óptico, aproximadamente 0,2 μm. Por tanto, aunque la potenciación por vídeo permite la visualización de los microtúbulos, aparecen como imágenes turbias a menos de 0,2 μm de diámetro y un microtúbulo individual no puede ser distinguido de un haz de estructuras adyacentes.

La microscopía óptica se ha llevado al nivel del análisis molecular mediante métodos que marcan moléculas específicas y que pueden ser visualizadas dentro de las células. Genes específicos o transcritos de ARN se pueden detectar mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos de secuencia complementaria, y las proteínas pueden detectarse usando anticuerpos apropiados (véase el Cap. 3). Tanto las sondas de ácidos nucleicos como los anticuerpos se pueden señalar con variedad de marcadores que permitan su visualización en el microscopio óptico, permitiendo determinar la localización de moléculas específicas en células individuales.

La **microscopía de fluorescencia** se utiliza extensamente y es un método muy sensible para el estudio de la distribución intracelular de las moléculas (Fig. 1.28). Se utiliza una tinción fluorescente para marcar las moléculas que intere-




*Figura 1.27*
**Microscopía de interferencia-contraste diferencial potenciada con video.** El procesamiento de una imagen electrónica permite la visualización de microtúbulos individuales. (Cortesía de E. D. Salmon, University of North Carolina, Chapel Hill.)

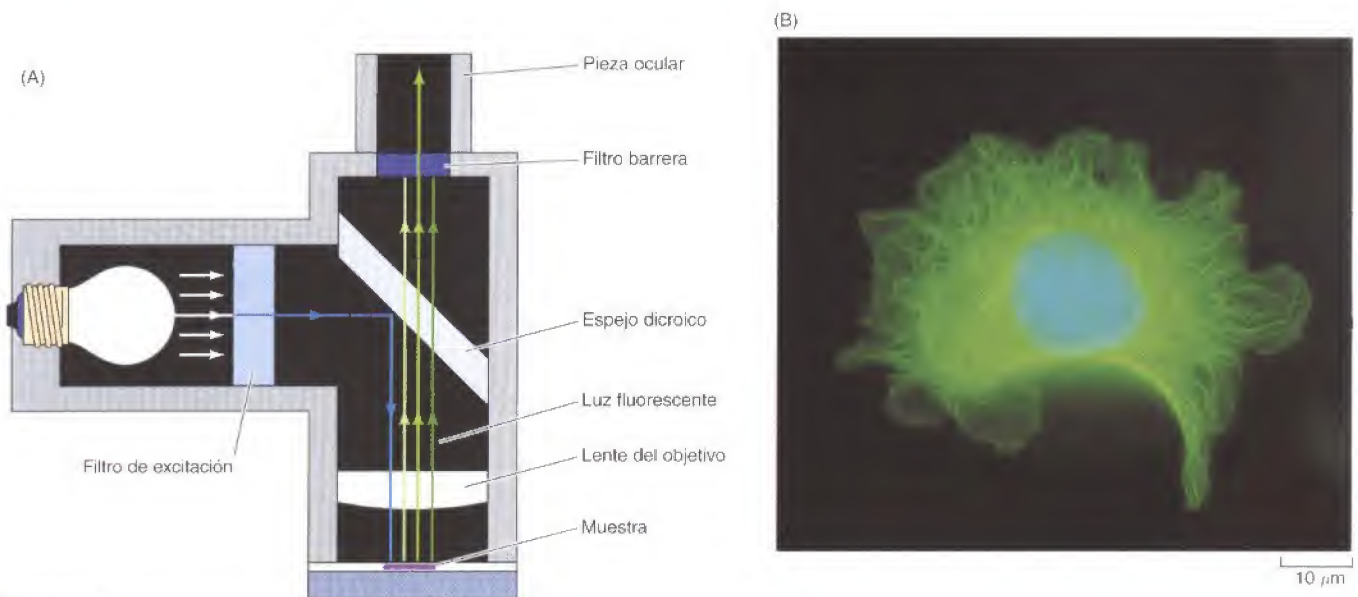



*Figura 1.28*
**Microscopía de fluorescencia.** (A) La luz pasa a través de un filtro de excitación para seleccionar la luz de la longitud de onda (por ej., azul) que excita el tinte fluorescente. Después un espejo dicroico desvía la luz excitada hacia la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra (por ej., verde) pasa a través de un espejo dicroico y un segundo filtro (el filtro barrera) para seleccionar la luz de longitud de onda emitida por el tinte. (B) Micrografía fluorescente de un pulmón de tritón en el que el ADN está teñido de azul y los microtúbulos en el citoplasma de verde. (Conly S. Rieder/Biological Photo Service.)

san tanto en células fijadas o vivas. La tinción fluorescente es una molécula que absorbe la luz a una longitud de onda y emite luz a una segunda longitud de onda. Esta fluorescencia se detecta mediante la iluminación de la muestra con una luz de una longitud de onda que excita al tinte fluorescente, usándose más tarde filtros apropiados para detectar la longitud de onda específica que emite el tinte. La microscopía fluorescente se puede utilizar para estudiar una gran variedad de moléculas dentro de las células. Una de las aplicaciones más frecuentes es la señalización de anticuerpos con tintes fluorescentes dirigidos contra una proteína específica, de manera que se pueda determinar la distribución intracelular de la proteína.

Un avance reciente importante en la microscopía de fluorescencia ha sido el empleo de la **proteína verde fluorescente (GFP: *green fluorescent protein*)** de las medusas para visualizar proteínas en el interior de células vivas. La GFP puede fusionarse con cualquier proteína de interés mediante métodos estándar de ADN recombinante, y la proteína marcada con GFP puede a continuación introducirse en células y detectarse por microscopía de fluorescencia, sin necesidad de fijación y tinción de las células tal y como se necesitaría para la detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos. Gracias a su versatilidad, el uso de GFP está muy extendido en biología celular, y ha sido empleada para seguir la localización y movimientos de una amplia variedad de proteínas en el interior de células vivas (Figura 1.29).

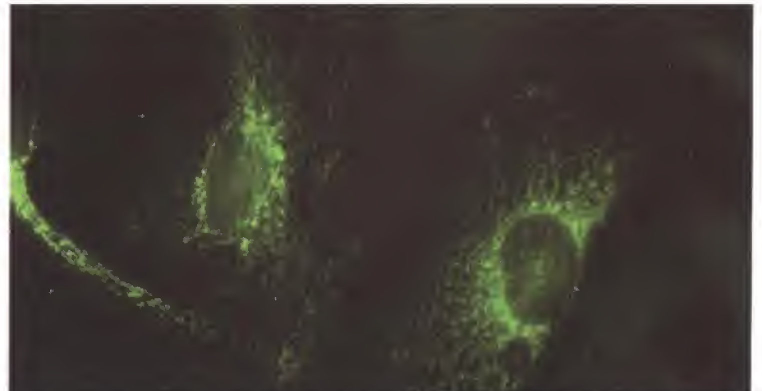


*Figura 1.29*
**Microscopía de fluorescencia de una proteína marcada con GFP.** Una proteína mitocondrial fusionada con GFP fue introducida en células humanas en cultivo y visualizada por microscopía de fluorescencia. (Cortesía de BD Biosciences Clontech.)

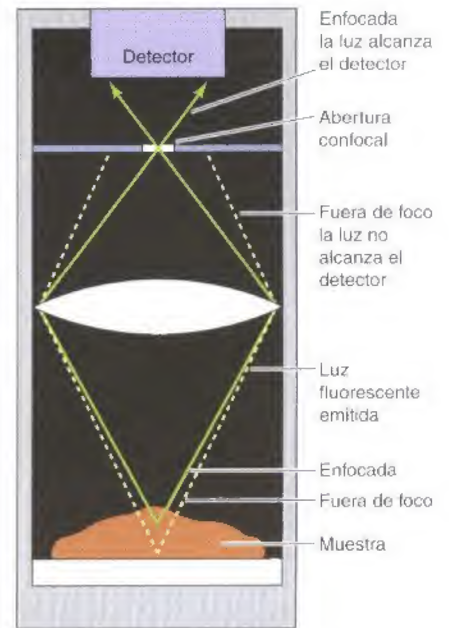



*Figura 1.30*
**Microscopía confocal.** Un punto de luz es enfocado en la muestra a una distancia determinada, y la luz fluorescente emitida se recoge en un detector. Antes de alcanzar el detector, la luz fluorescente emitida por la muestra debe pasar a través de una apertura confocal situada en el punto en que la luz emitida desde la distancia elegida de la muestra se enfoca. Como resultado, solamente se detecta la luz enfocada emitida desde la distancia elegida del espécimen.

La **microscopía confocal** combina la microscopía fluorescente con el análisis electrónico de la imagen para obtener imágenes tridimensionales. Un pequeño punto de luz, normalmente producido por un láser, se enfoca en la muestra a una profundidad determinada. La luz fluorescente emitida se recoge utilizando un detector, como una video cámara. Antes de que la luz emitida alcance el detector, esta debe atravesar el agujero de una aguja (llamado apertura focal) situada precisamente en el punto donde la luz emitida desde la profundidad elegida de la muestra es enfocada (Fig. 1.30). Por tanto, solamente la luz emitida desde el plano de enfoque es capaz de alcanzar el detector. El barrido a lo largo de la muestra genera una imagen del plano de enfoque en dos dimensiones, una imagen mucho más detallada que la obtenida con la microscopía fluorescente habitual (Fig. 1.31). Además, es posible fundir una serie de imágenes obtenidas a distintas profundidades para reconstruir una imagen tridimensional de la muestra.

La **microscopía de excitación multifotónica** es una alternativa a la microscopía tridimensional que también puede aplicarse a las células vivas. La muestra se ilumina con una luz de una longitud de onda tal que la excitación del tinte fluorescente requiera la absorción simultánea de dos o más fotones (Fig 1.32). La probabilidad de que los dos fotones exciten simultáneamente al tinte fluorescente solamente es importante en el punto de la muestra en el que el láser está enfocado, de tal manera que la fluorescencia sólo se emite desde el plano de enfoque de la luz. Esta potente excitación automáticamente proporciona una solución tridimensional, sin necesidad de que la luz emitida atraviese la apertura de una aguja, como en la microscopía confocal. Además, la localización de la excitación reduce el daño de la muestra, permitiendo imágenes tridimensionales de células vivas.

## *Microscopía electrónica*

Debido a la limitada resolución del microscopio óptico, el análisis de los detalles de la estructura celular ha necesitado una técnica de microscopía mucho más poderosas, llamada microscopía electrónica, que fue desarrollada en los años

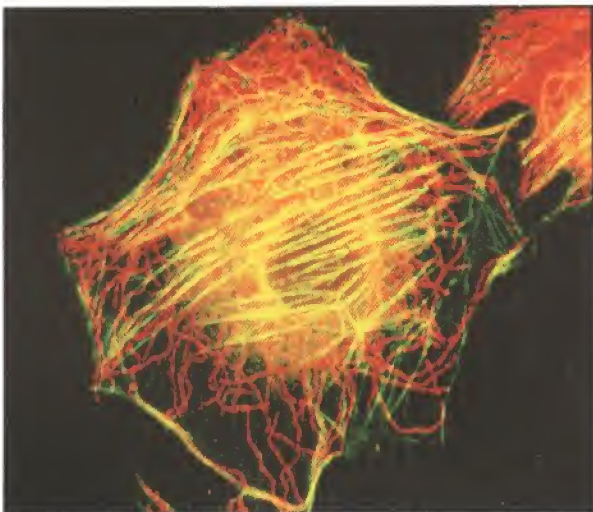


*Figura 1.31*
**Micrografía confocal de células humanas.** Microtúbulos y filamentos de actina aparecen teñidos con colorantes fluorescentes rojo y verde, respectivamente. (K. G. Murti/ Visuals Unlimited.)

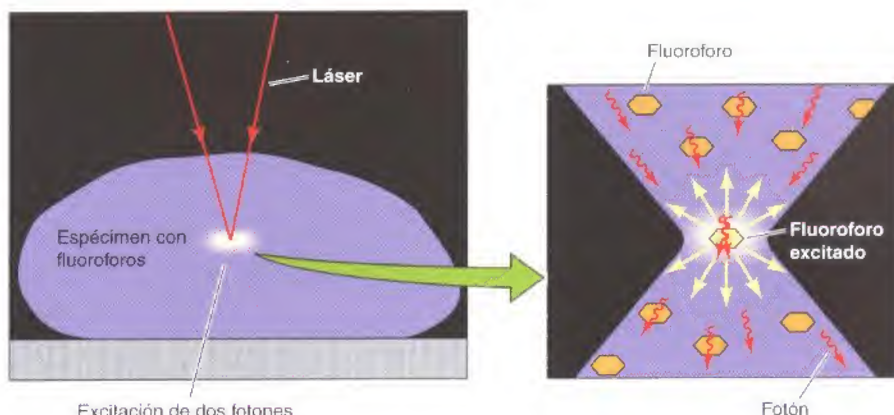



*Figura 1.32*
**Microscopía por excitación de dos fotones.** Se requiere la absorción simultánea de dos fotones para excitar el tinte fluorescente. Esto sólo sucede en el punto de la muestra donde se enfoca la luz, de tal forma que la luz fluorescente sólo se emite desde la distancia elegida de la muestra.

1930 y aplicada por primera vez a muestras biológicas por Albert Claude, Keith Porter y George Palade en los años 1940 y 1950. El microscopio electrónico puede alcanzar una resolución mucho mayor que la obtenida con el microscopio óptico puesto que la longitud de onda de los electrones es menor que la de la luz. La longitud de onda de los electrones en un microscopio electrónico puede ser de hasta 0,004 nm —alrededor de 100.000 veces más corta que la longitud de onda de la luz visible—. Teóricamente, esta longitud de onda puede alcanzar una resolución de 0,002 nm, pero tal resolución no ha podido obtenerse en la práctica, puesto que no solo está determinada por la longitud de onda sino también por la apertura numérica de la lente del microscopio. La apertura numérica es un factor limitante para la microscopía electrónica puesto que las propiedades inherentes de las lentes electromagnéticas limitan sus ángulos de apertura alrededor de 0,5 grados, correspondientes a aberturas numéricas de solo 0,01. Por tanto, bajo condiciones óptimas, el poder de resolución del microscopio electrónico es aproximadamente de 0,2 nm. Además, la resolución que se puede obtener con muestras biológicas está limitada por la falta de contraste inherente. En consecuencia, en muestras biológicas el límite práctico de resolución para el microscopio electrónico es desde 1 a 2 nm. Aunque esta resolución es mucho menor que la predicha por la longitud de onda de los electrones, representa una mejora de más de cien veces del poder de resolución del microscopio óptico.

En el estudio de las células se utilizan dos tipos de microscopía electrónica —transmisión y barrido. En principio, la **microscopía electrónica de transmisión** es similar a la observación de células teñidas con sales de metales pesados, que proporcionan contraste mediante los electrones dispersos. Un haz de electrones pasa a través de la muestra y se enfoca para formar una imagen en una pantalla fluorescente. Los electrones que chocan con un ión de metal pesado cuando pasan por las muestra se reflejan y no contribuyen a la imagen final, de tal forma que las zonas teñidas de la muestra aparecen oscuras.

Las muestras que se van a analizar por microscopía de transmisión de electrones se pueden preparar con tintes positivos o negativos. En la tinción positiva, las muestras de tejido se cortan en secciones finas y se tiñen con sales de metales pesados (como el tetróxido de osmio, acetato de uranilo, y citrato de plomo) que reaccionan con lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. Estos iones de metales pesados se unen a gran variedad de estructuras celulares, que aparecen oscuras en la imagen final (Fig. 1.33). Los procedimientos de tinción positiva también se pueden utilizar para identificar macromoléculas específicas dentro de las células. Por ejemplo, los anticuerpos marcados con metales pesados densos en electrones (como partículas de oro) se utilizan con frecuencia para determinar la localización subcelular de proteínas específicas con el microscopio electrónico. Este método es similar al uso de anticuerpos marcados con tintes fluorescentes en la microscopía fluorescente.

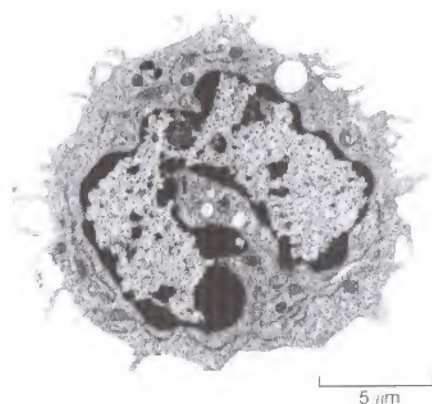



*Figura 1.33*
**Tinción positiva.** Micrografía de transmisión de electrones de un glóbulo blanco teñido positivamente. (Don W. Fawcet/Visuals Unlimited.)

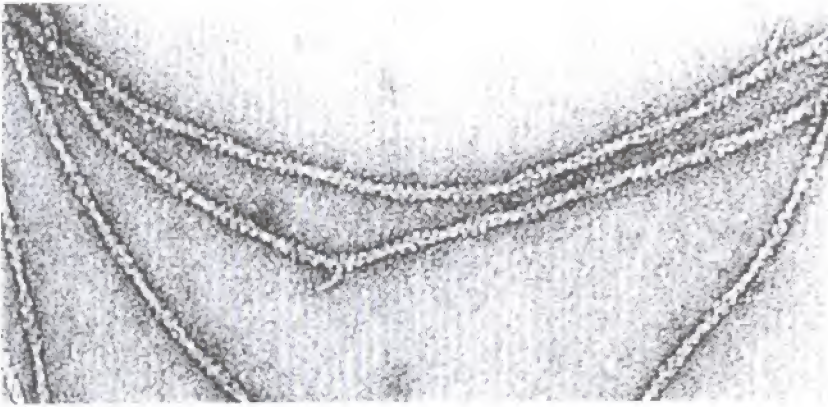


*Figura 1.34*
**Tinción negativa.** Micrografía de transmisión de electrones de filamentos de actina teñidos negativamente. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

La tinción negativa resulta útil para la visualización de estructuras biológicas intactas, como las bacterias, los orgánulos subcelulares aislados, y macromoléculas (Fig. 1.34). En este método, la muestra biológica se deposita en una lámina, permitiendo que una gota de metal pesado rodee su superficie. La muestra sin teñir se rodea con una lámina densa en electrones, produciendo una imagen en la que la muestra aparece clara en contra de un fondo oscuro.

El **sombreado de metal** es otra técnica que se utiliza para visualizar la superficie de estructuras subcelulares aisladas o macromoléculas en el microscopio de transmisión de electrones (Fig. 1.35). La muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado, como el platino. Se pulveriza el metal en la muestra desde un determinado ángulo, de tal manera que las superficies de la muestra que se encuentran de frente al pulverizador de moléculas de metal evaporadas se cubren más que las otras. Esta diferencia de envoltura crea un efecto de sombra, dando a la muestra una apariencia tridimensional en las micrografías electrónicas.

La preparación de las muestras mediante la **separación por congelación o criofractura**, en combinación con el sombrado de metal, ha resultado particularmente importante en los estudios de la estructura de la membrana. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido (a −196 C) y se separan con el filo de un bisturí. El proceso con frecuencia separa la bicapa lipídica, mostrando las caras interiores de la membrana celular (Fig. 1.36). La muestra se sombrea más tarde con platino, y el material biológico se disuelve en ácido, produciéndose una réplica de metal de la superficie de la muestra. El examen de tales réplicas en el microscopio electrónico revela muchas alteraciones de la superficie, que corresponden a las proteínas que ocupan la bicapa lipídica. Una variación de la separación por congelación llamada **grabado por congelación** permite la observación de las superficies externas de las membranas celulares además de sus caras internas.

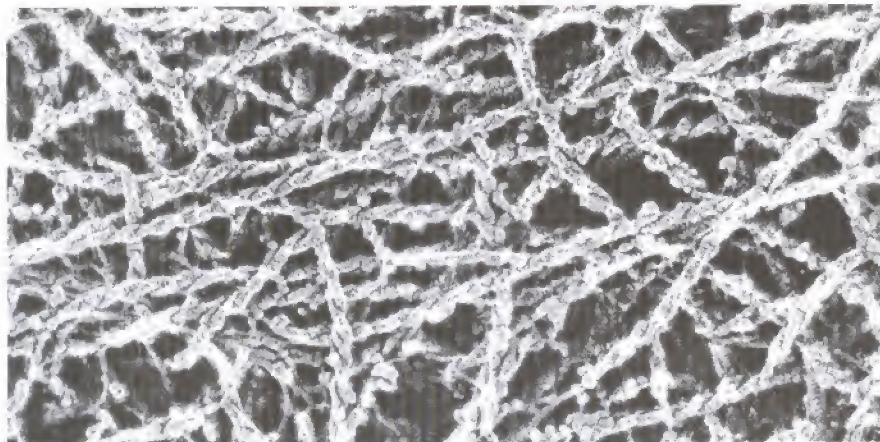
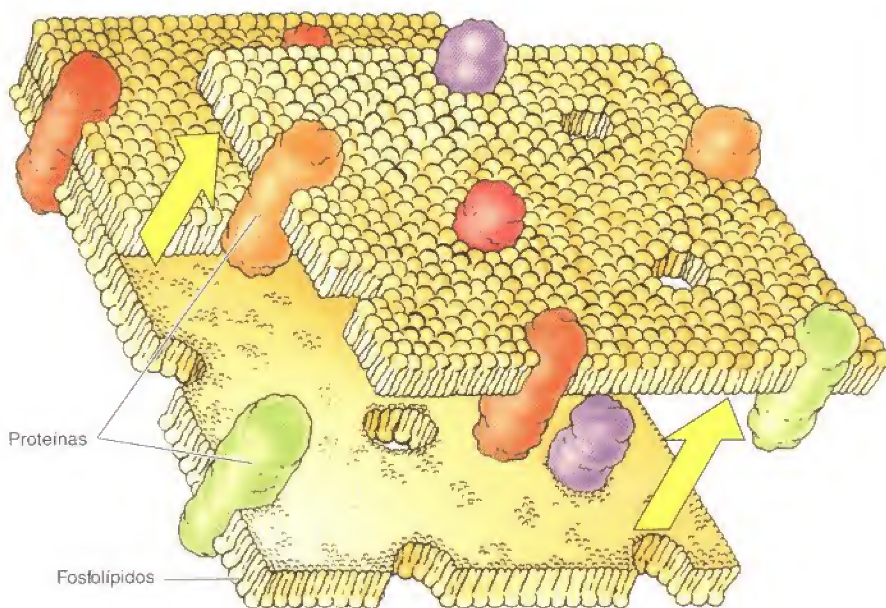


*Figura 1.35*
**Sombreado de metal.** Micrografía electrónica de filamentos de actina/miosina del citoesqueleto preparada mediante sombreado de metal. (Don W. Fawcett, J. Heuser/Photo Researchers, Inc.)

(A)




(B)

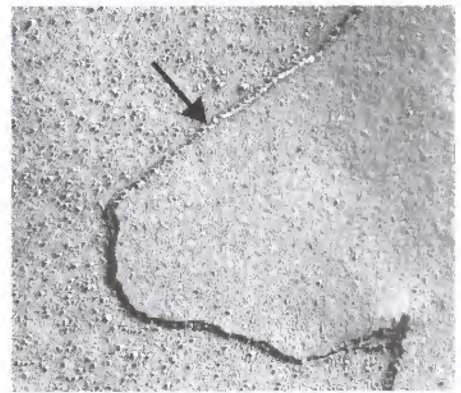


*Figura 1.36*
**Separación por congelación.** (A) La separación por congelación divide la bicapa lipídica, dejando las proteínas embebidas en la membrana asociadas a una de las dos partes de la membrana. (B) Micrografía de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes separadas por congelación. Las proteínas que cubren la bicapa aparecen como partículas intermembranosas (flecha). (Don W. Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

El segundo tipo de microscopía electrónica, a **microscopía electrónica de barrido**, se utiliza para obtener una imagen tridimensional de las células (Fig. 1.37). En la microscopía electrónica de barrido el haz de electrones no pasa a través de la muestra. En su lugar, la superficie de la célula se recubre de un metal pesado, y se utiliza un haz de electrones que barre toda la muestra. Los electrones aislados o emitidos por la superficie de la muestra se recogen para generar una imagen tridimensional a la vez que el haz de electrones se mueve a lo largo de la célula. Debido a que la resolución de la microscopía electrónica de barrido solo es de unos 10 nm, su uso está restringido al estudio de células completas en lugar de suborgánulos celulares o macromoléculas.

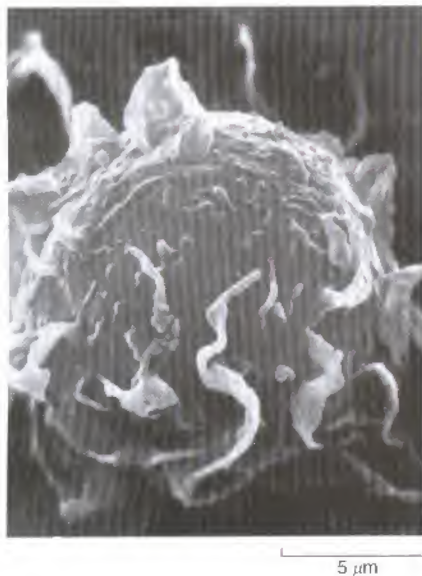



*Figura 1.37*
**Microscopía electrónica de barrido.** Micrografía electrónica de barrido de un macrófago. (David Phillips/Visuals Unlimited.)

## *Separación subcelular*

Aunque el microscopio electrónico ha permitido una observación detallada de la estructura celular, la microscopía en exclusiva no resulta suficiente para definir las funciones de los numerosos componentes de las células eucariotas. Para contestar muchas de las preguntas que atañen a la función de los orgánulos celulares, ha sido necesario aislar a los orgánulos de las células eucariotas de forma que puedan utilizarse para estudios bioquímicos. Normalmente esto se realiza mediante la **centrifugación diferencial** —un método desarrollado por Albert Claude, Christian de Duve, y sus colegas en los años 1940 y 1950 para separar los componentes de las células de acuerdo con sus tamaños y densidades.

El primer paso en la separación subcelular es la rotura de la membrana plasmática bajo condiciones que no destruyan los componentes internos de la célula. Se utilizan diferentes métodos, que incluyen la sonicación (exposición a sonidos de alta frecuencia), reducción en un homogeneizador mecánico, o el tratamiento con una batidora de alta velocidad. Todos estos procedimientos rompen la membrana plasmática y el retículo endoplasmático en pequeños fragmentos mientras que dejan a otros componentes de la célula (como el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondria, y cloroplastos) intactos.

La suspensión de las células rotas (llamado lisado u homogeneizado) se fracciona en sus componentes mediante una serie de centrifugaciones en una **ultracentrífuga** que procesa las muestras a una alta velocidad (más de

100.000 rpm) para producir fuerzas alrededor de 500.000 veces mayores que la gravedad. Esta fuerza determina que los componentes celulares se sitúen al fondo del tubo de centrifugación y que formen un precipitado (proceso llamado sedimentación) en un grado que depende del tamaño y la densidad, sedimentándose las estructuras más grandes y pesadas con mayor rapidez (Fig. 1.38). Normalmente el homogeneizado celular se centrifuga la primera vez a velocidad lenta, que sedimenta solamente las células que no se han roto y las grandes estructuras celulares —los núcleos. Por tanto, se puede obtener una fracción rica en núcleos del precipitado que se forma en la centrifugación a velocidad lenta mientras que otros componentes celulares continúan suspendidos en el sobrenadante (el resto de la solución). El sobrenadante se centrífuga después a velocidad rápida para sedimentar mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, y peroxisomas. La recentrifugación del sobrenadante a gran velocidad sedimenta fragmentos de la membrana plasmática y del retículo endoplasmático. Una cuarta centrifugación a gran velocidad sedimenta ribosomas, dejando exclusivamente la porción soluble del citoplasma (el citosol) en el sobrenadante.

Las fracciones obtenidas de la centrifugación diferencial corresponden a preparaciones de orgánulos enriquecidas, pero no puras. Se puede obtener un mayor nivel de purificación mediante la **centrifugación en gradiente de densidad**, en la que los orgánulos se separan mediante la sedimentación en función al gradiente de una sustancia densa, como la sacarosa. En la **centrifugación por velocidad**, el material primario se estratifica en el gradiente de sacarosa (Fig. 1.39). Partículas de diferentes tamaños se sedimentan por el gradiente en diferentes escalas, moviéndose como bandas discretas. Después de la centrifugación, la colección de fracciones individuales del gradiente proporciona la información necesaria para separar a los orgánulos de tamaños similares, como mitocondrias, lisosomas, y peroxisomas.

La **centrifugación de equilibrio** en gradiente de densidad puede utilizarse para separar componentes subcelulares función de su migración en un gradiente de densidad, independientemente de su tamaño y forma. En este procedimiento, la muestra se centrífuga en un gradiente que contiene una alta concentración de sacarosa o cloruro de cesio. En lugar de separarse de acuerdo con su velocidad de sedimentación, las partículas de la muestra se centrifugan hasta que han alcanzado una posición de equilibrio en la que su densidad es igual a la de la solución de sacarosa o cloruro de cesio. Estas centrifugaciones de equilibrio resultan útiles a la hora de separar diferentes tipos de membranas y son lo suficientemente sensibles para separar macromoléculas marcadas con diferentes isótopos. Un ejemplo clásico, discutido en el Capítulo 3, es el análisis de la replicación del ADN mediante la separación de las moléculas de ADN que contienen isótopos pesados y ligeros de nitrógeno ($^{15}N$ y $^{14}N$) mediante la centrifugación de equilibrio en gradientes de cloruro de cesio.

### *Crecimiento de las células animales en cultivo*

La habilidad para estudiar las células depende en su mayoría de la facilidad con la que pueden crecer y ser manipuladas en el laboratorio. Aunque el proceso es técnicamente mucho más difícil que el cultivo de bacterias o levaduras, una gran variedad de células animales y vegetales pueden ser cultivadas y manipuladas en cultivo. Los sistemas de cultivo celular *in vitro* han permitido a los científicos estudiar el crecimiento y diferenciación celular, así como desarrollar manipulaciones genéticas necesarias para entender la estructura y función de los genes.

Los cultivos de células animales se inician mediante la dispersión de una parte de tejido en una suspensión de sus componentes celulares, que se añade más tarde a una placa de cultivo que contiene un medio nutritivo. La mayoría de los tipos de células animales, como los fibroblastos y las células epiteliales, se adhieren y crecen en la superficie plástica de las placas usadas para el cultivo de células (Fig. 1.40). Se utilizan con frecuencia embriones y tumores como

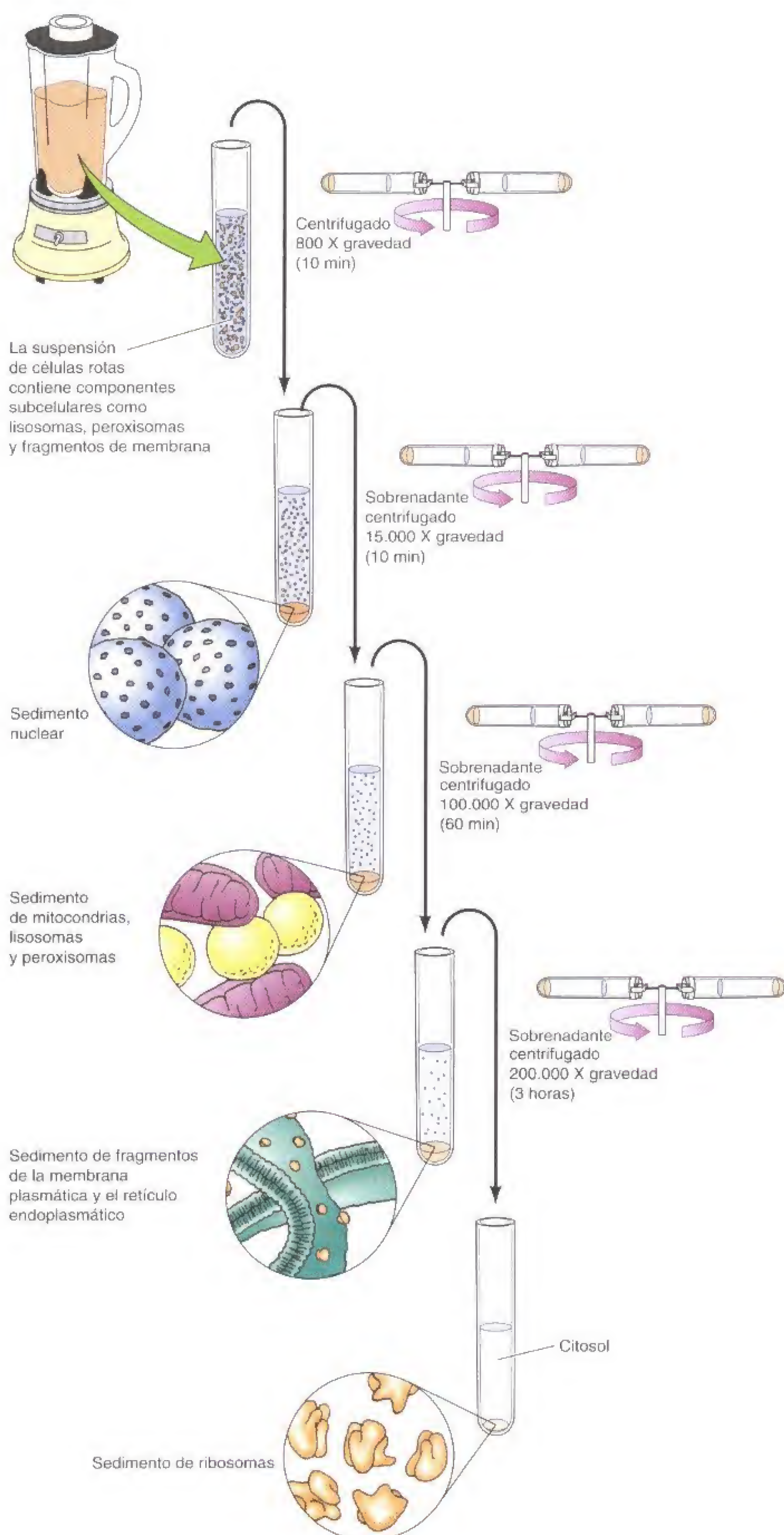



*Figura 1.38*
**División subcelular.** Las células se lisan y los componentes subcelulares se separan mediante una serie de centrifugaciones que van aumentando de velocidad. Después de cada centrifugación, los orgánulos que han sedimentado en el fondo del tubo se recogen en forma de precipitado sólido. El sobrenadante se centrifuga a una mayor velocidad para sedimentar el siguiente orgánulo más grande.

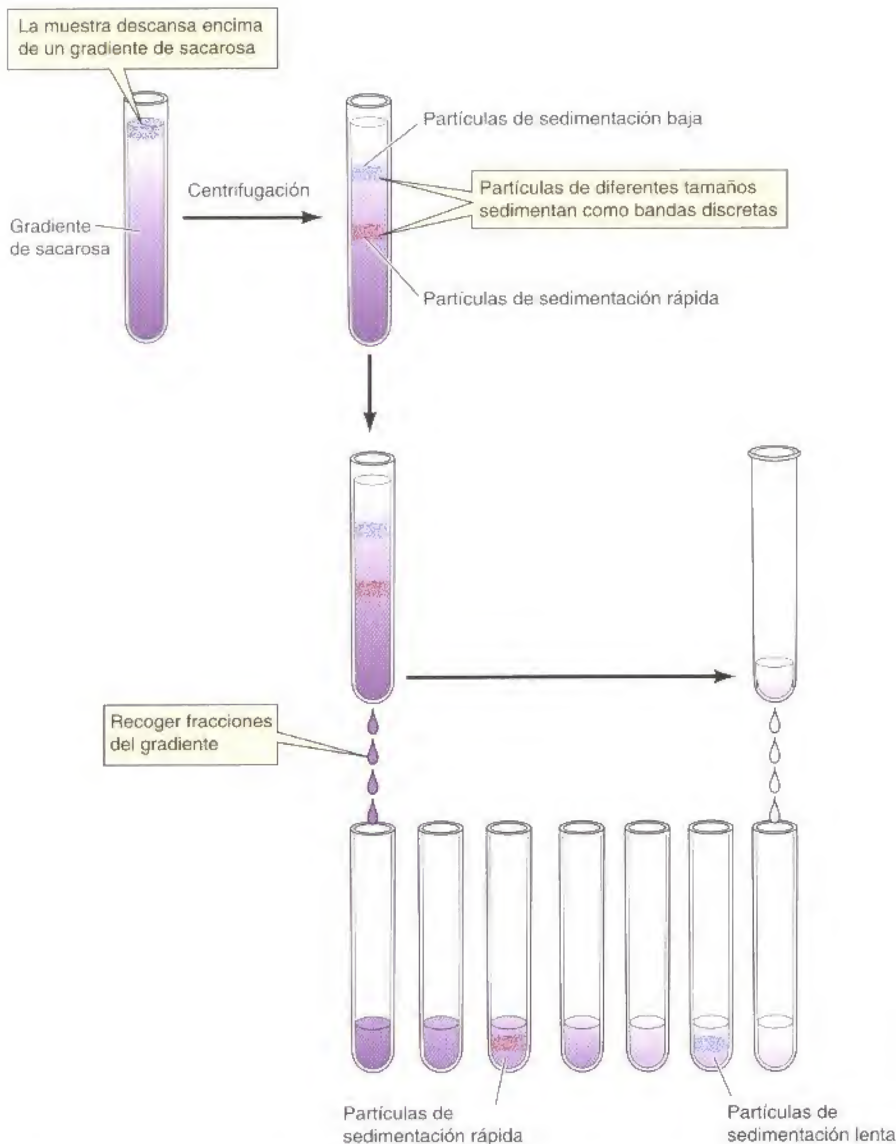



*Figura 1.39*
**Velocidad de centrifugación en un gradiente de densidad.** La muestra descansa encima de un gradiente de sacarosa, y partículas de diferentes tamaños sedimentan a través del gradiente en forma de bandas discretas. Las partículas separadas pueden recogerse en fracciones individuales del gradiente, que pueden obtenerse simplemente punzando el fondo del tubo de centrifugación y recogiendo las gotas.

material de iniciación, debido a que contienen células de crecimiento rápido. Los fibroblastos embrionarios crecen particularmente bien en cultivo y en consecuencia son uno de los tipos de células animales más estudiados. Bajo condiciones apropiadas, sin embargo, algunas células especializadas también pueden crecer en cultivo, permitiendo así el estudio de sus propiedades en un ambiente experimental controlado. Las **células madre embrionarias** constituyen un ejemplo especialmente notable. Estas células se establecen en cultivo a partir de embriones tempranos y mantienen su capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares presentes en los organismos adultos. En consecuencia, las células madre embrionarias han representado un papel importante en el estudio de las funciones de una variedad de genes del desarrollo murino, además de ofrecer la posibilidad de contribuir al tratamiento de enfermedades humanas, al constituir una fuente de tejido para las terapias de trasplante.

El medio de cultivo necesario para la propagación de células animales es mucho más complejo que el medio mínimo para sustentar el crecimiento de las bacterias y levaduras. Los primeros estudios de cultivo celular utilizaban un medio que consistía en componentes indefinidos, como plasma, suero, y extractos embrionarios. Se avanzó aún más en 1955, cuando Harry Eagle describió el primer medio definido que sustentaba el crecimiento de las células animales.




*Figura 1.40*
**Células animales en cultivo.** Micrografía electrónica de barrido de fibroblastos humanos unidos a la superficie del disco de cultivo (David M. Phillips/Visuals Unlimited.)



## Experimento clave

# *Cultivo celular animal*

**Requisitos nutritivos de las células de mamíferos en cultivos de tejidos**
Harry Eagle
National Institutes of Health, Bethesda, MD
*Science, Volumen 122, 1955, págs. 501-504*



Harry Eagle

### Contexto

Los primeros cultivos celulares se basaban en el crecimiento celular a partir de fragmentos de tejido que estaban embebidos en coágulos de plasma, un sistema de cultivo que estaba lejos de ser adecuado para el análisis experimental. A finales de los años 1940, uno de los mayores avances fue establecer líneas celulares que crecían a partir de células aisladas adheridas a la superficie de las placas de cultivo. Pero estas células seguían creciendo en un medio indefinido que consistía en diversas combinaciones de suero y extractos embrionarios. Por ejemplo, una de las líneas cancerígenas humanas más utilizadas (llamada células HeLa) se estableció por primera vez en 1952 mediante su crecimiento en un medio que consistía en plasma de pollo, extractos de embrión ovino, y suero del cordón umbilical humano. El uso de tal complejo y el medio de cultivo indefinido hicieron imposible el análisis de las necesidades específicas de crecimiento de las células animales. Harry Eagle fue el primero en resolver este problema, llevando a cabo un análisis sistemático de los nutrientes necesarios para sustentar el crecimiento de las células animales en cultivo.

### Experimentos

Eagle estudió el crecimiento de dos líneas celulares preestablecidas: las células HeLa y una línea de fibroblastos del ratón llamada células L. Fue capaz de hacer crecer a estas células en un medio compuesto por una mezcla de sales, carbohidratos, aminoácidos, y vitaminas, y un suplemento de proteínas séricas. Mediante la variación sistemática de los componentes del medio, Eagle fue capaz de determinar los nutrientes específicos necesarios para el crecimiento celular. Además de sales y glucosa, estos nutrientes incluyen 13 aminoácidos y diversas vitaminas. También resultaron necesarias una pequeña cantidad de proteínas séricas. El medio básico desarrollado por Eagle está descrito en la siguiente tabla, reproducida de su ensayo de 1955.

### Impacto

El medio descrito por Eagle todavía resulta el medio básico utilizado para los cultivos de células animales. Su uso ha permitido a los investigadores el crecimiento de una basta variedad de células bajo condiciones experimentales definidas, las cuales han sido críticas para el estudio del crecimiento y la diferenciación de las células animales, incluyendo la identificación de los factores de crecimiento presentes en el suero —ahora se incluyen polipéptidos que controlan el comportamiento de las células indivisuales dentro del animal intacto—.

Tabla 4. Medio básico para el cultivo de la célula HeLa y de los fibroblastos de ratón *(10)*

| L-aminoácidos* (*mM*) | | Vitaminas‡ (*mM*) | | Diversos | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arginina | 0,1 | Biotina | $10^{-3}$ | Glucosa | 5 m*M*§ |
| Cisteína | 0,05 (0,02)† | Colina | $10^{-3}$ | Penicilina | 0,005%# |
| Glutamina | 2,0 (1,0)‖ | Ácido fólico | $10^{-3}$ | Estreptomicina | 0,005%# |
| Histidina | 0,05 (0,02)† | Nicotinamida | $10^{-3}$ | Rojo fenol | 0,0005%# |
| Isoleucina | 0,2 | Ácido pantoténico | $10^{-3}$ | Para estudios de nutrición celular | |
| Leucina | 0,2 (0,1)† | Piridoxal | $10^{-3}$ | Diálisis suero de caballo, 1%† | |
| Lisina | 0,2 (0,1)† | Tiamina | $10^{-3}$ | Diálisis suero humano, 5% | |
| Metionina | 0,05 | Riboflavina | $10^{-4}$ | | |
| Fenilalanina | 0,1 (0,05)† | Sales (n*M*)§ | | Para cultivos de cantidad | |
| Treonina | 0,2 (0,1)† | | | Suero de caballo completo, 5%† | |
| Triptófano | 0,02 (0,01)† | NaCl | 100 | Suero humano completo, 10% | |
| Tirosina | 0,1 | KCl | 5 | | |
| Valina | 0,2 (0,1)† | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 5 | | |
| | | $NaHCO_3$ | 20 | | |
| | | $CaCl_2$ | 1 | | |
| | | $MgCl_2$ | 0,5 | | |

* Es conveniente guardarlo en el refrigerador como una solución única que contiene 20 veces la concentración indicada de cada aminoácido.
† Para el fibroblasto de ratón
‡ Es conveniente guardarlo como una solución única que contenga 100 o 1.000 veces la concentración indicada de cada vitamina; mantener congelado.
§ Es conveniente guardarlo en el refrigerador en dos soluciones una que contenga NaCl, KCl, $NaH_2PO_4$, $NaHCO_3$ y glucosa diez veces la concentración indicada para cada una, y la segunda que contenga $CaCl_2$ y $MgCl_2$, 20 veces la concentración indicada.
‖ Es conveniente guardarlo como una solución 100 m*M*; congelado cuando no se use.
\# Es conveniente guardarlo como una solución única que contenga 100 veces la concentración indicada de penicilina, estreptomicina, y rojo fenol.

Además de sales y glucosa, el medio utilizado para los cultivos de células animales contiene varios aminoácidos y vitaminas, que las células no pueden producir por sí mismas. El medio de crecimiento de muchas células animales en cultivo también incluye suero, que sirve como fuente de factores de crecimiento polipeptídicos que son necesarios para estimular la división celular. Se han identificado varios factores de crecimiento. Actúan como reguladores críticos del crecimiento y la diferenciación celular en organismos multicelulares, proporcionando señales mediante las que diferentes células se comunican unas con otras. Por ejemplo, una función importante de los fibroblastos de la piel en el animal intacto es la proliferación cuando se necesita reparar el daño causado por un corte o una herida. Su división está desencadenada por un factor de crecimiento liberado por las plaquetas durante la coagulación, derivando la estimulación de la proliferación de los fibroblastos del entorno del tejido dañado. La identificación de los factores de crecimiento individuales ha hecho posible el cultivo de una variedad de células en un medio libre de suero (medio en el que el suero ha sido reemplazado por factores de crecimiento específicos necesarios para la proliferación de las células en cuestión).

Los cultivos iniciales de células establecidos a partir de un tejido se denominan **cultivos primarios** (Fig. 1.41). Las células en un cultivo primario normalmente crecen hasta cubrir la superficie de la placa de cultivo. Después pueden ser retiradas de la placa y reponerse a baja densidad para formar cultivos secundarios. Este proceso se puede repetir muchas veces, aunque la mayoría de las células normales no pueden crecer en cultivo indefinidamente. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales admiten desde 50 a 100 duplicaciones de la población, después de las cuales paran de crecer y mueren. Por el contrario, las células que se derivan de tumores con frecuencia proliferan indefinidamente en cultivo y reciben el nombre de **líneas celulares inmortales**. Además, se ha conseguido aislar un importante número de líneas celulares inmortalizadas de roedores procedentes de cultivos de fibroblastos normales. En lugar de morir como la mayoría de sus homólogos, algunas células de estos cultivos continúan proliferando indefinidamente, formando líneas celulares como aquellas que se derivan de los tumores. Tales líneas celulares permanentes han resultado muy útiles para muchos tipos de experimentos ya que proporcionan una fuente continua y uniforme de células que pueden ser manipuladas, clonadas, y cultivadas indefinidamente en el laboratorio.

Incluso bajo condiciones óptimas, el tiempo de división de la mayoría de las células animales que crecen activamente es del orden de 20 horas —diez veces más largo que el tiempo de división de las levaduras—. Por tanto, los experimentos con células animales cultivadas son mucho más difíciles y más largos que aquellos con bacterias y levaduras. Por ejemplo, el crecimiento de una colonia visible de células animales a partir de una sola célula dura una semana o más, mientras que las colonias de *E. coli* o de levaduras se desarrollan durante una noche. No obstante, las manipulaciones genéticas de las células animales en cultivo resultan indispensables para el entendimiento de la estructura y función de la célula.

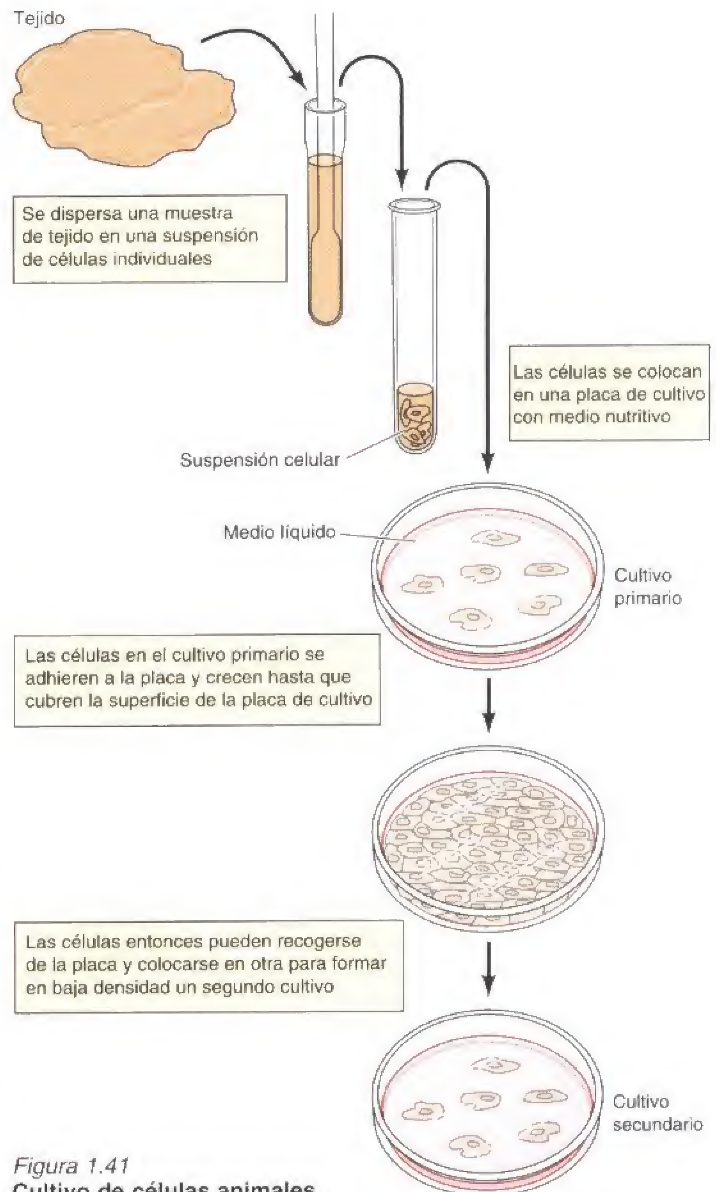



*Figura 1.41*
**Cultivo de células animales.**



*Figura 1.42*
**Células vegetales en cultivo.** Una masa indiferenciada de células vegetales (un callo) creciendo en un medio sólido. (John N. A. Lott/Biological Photo Service.)

## *Cultivo de células vegetales*

Las células vegetales también pueden ser cultivadas en un medio nutritivo que contenga las moléculas apropiadas para la regulación del crecimiento. Al contrario que los factores de crecimiento polipeptídicos que regulan la proliferación de la mayoría de las células animales, los reguladores del crecimiento de las células vegetales son pequeñas moléculas capaces de atravesar la pared celular vegetal. Cuando se suministran mezclas apropiadas con estas moléculas reguladoras del crecimiento, muchos tipos de células vegetales proliferan en cultivo, produciendo una masa de células no diferenciadas denominadas **callo** (Fig. 1.42).

Es importante tener en cuenta que muchas células vegetales son capaces de formar cualquiera de los distintos tipos celulares y tejidos necesarios para regenerar una planta completa. En consecuencia, mediante la manipulación apropiada de nutrientes y de las moléculas reguladoras del crecimiento, las células vegetales no diferenciadas en cultivo pueden ser inducidas para formar variedad de tejidos vegetales, incluyendo raíces, tallos, y hojas. En muchos casos, incluso una planta entera puede regenerarse a partir de una sola célula en cultivo. Además de su interés teórico, la habilidad de producir una nueva planta desde una sola célula manipulada en cultivo hace posible la introducción de alteraciones genéticas en las plantas, abriendo importantes posibilidades para la ingeniería genética agrícola.

## *Virus*

Los virus son parásitos intracelulares incapaces de replicarse por sí mismos. Se reproducen mediante la infección de células huésped y la usurpación de la maquinaria celular para producir más partículas virales. En sus formas más simples, los virus consisten solamente en ácido nucleico genómico (ADN o ARN) rodeado de una cubierta proteínica (Fig. 1.43). Los virus son importantes para la biología molecular y celular porque proporcionan sistemas simples que pueden ser utilizados para investigar las funciones de las células. Ya que la replicación de los virus depende del metabolismo de las células infectadas, los estudios sobre virus han revelado muchos de los aspectos fundamentales de la biología celular. Estudios sobre los virus bacterianos contribuyeron sustancialmente a la comprensión de los mecanismos básicos de la genética molecular, y fueron los experimentos con virus vegetales (con el virus del mosaico del tabaco) los que demostraron por primera vez el potencial genético del ARN. Los virus animales

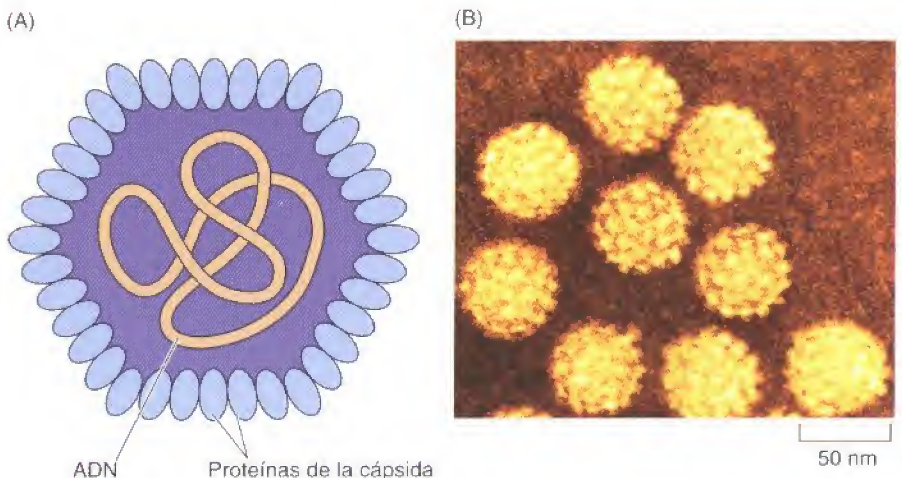
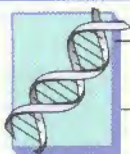



*Figura 1.43*
**Estructura de un virus animal.** (A) Partículas del papilomavirus que contienen una pequeña molécula de ADN circular encapsulada en una cubierta de proteínas (la cápsida). (B) Micrografía electrónica de partículas del virus del papiloma humano. Se han añadido colores artificiales. (B, Linda Standard/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)



## Medicina molecular

# *Virus y cáncer*

### La enfermedad

El cáncer incluye un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular incontrolada. El crecimiento de las células animales normales está cuidadosamente regulado para mantener las necesidades del organismo al completo. Por el contrario, las células cancerígenas crecen de manera descontrolada, invadiendo e interfiriendo en la función de tejidos y órganos normales. El cáncer es la segunda causa más común de muerte (después de las enfermedades cardíacas) en los Estados Unidos. Aproximadamente uno de cada tres americanos desarrollará cáncer en algún momento de su vida y, en espera a mejores avances en su tratamiento, cerca de uno de cada cuatro americanos morirá de esta enfermedad. Entender las causas del cáncer y el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento resultan por tanto los principales objetivos de la investigación médica.

### Bases moleculares y celulares

Actualmente sabemos que el cáncer es el resultado de mutaciones en los genes que normalmente controlan la proliferación celular. Los descubrimientos fundamentales que han conducido a la identificación de estos genes han surgido de los estudios de virus que causan cáncer en animales, el prototipo de los cuales fue aislado por Peyton Rous en 1911. Rous descubrió que los sarcomas (un cáncer del tejido conectivo) en pollos podían transmitirse mediante un virus, o RSV (siglas en inglés del virus del Sarcoma de Rous). Debido a que RSV es un retrovirus con un genoma de tan solo 10.000 pares de bases, éste podía someterse a análisis moleculares mucho más fácilmente que los complejos genomas de los pollos u otras células animales. Estos estudios condujeron a la identificación de un gen específico causante del cáncer (oncogén) transportado por el virus, y al descubrimiento de genes relacionados en las células normales de todas las especies de vertebrados, incluyendo a los humanos. Algunos cánceres en los humanos se sabe que están causados por virus; otros resultan de las mutaciones en los genes de las células normales de forma similar al primer oncogén identificado en el RSV.

### Prevención y tratamiento

Los cánceres humanos que están causados por virus incluyen el cervical y otros cánceres anogenitales (virus del papiloma), cáncer de hígado (virus de la hepatitis B y C), y algunos tipos de linfomas (virus Epstein-Barr y el virus humano linfotrópico de las células T). Juntos, estos cánceres inducidos por virus representan alrededor del 20 % de la incidencia de cáncer en el mundo. En principio, estos cánceres se podrían prevenir con vacunas en contra del virus responsable, consiguiéndose un progreso considerable en este área el desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus de la hepatitis B.

Otros cánceres humanos están causados por la mutación de genes en células normales, muchas de las cuales ocurren durante la vida del individuo en lugar de heredarse. Los estudios sobre los virus causantes de cánceres han proporcionado la identificación de muchos genes responsables de los cánceres no inducidos por virus, y el entendimiento de los mecanismos moleculares responsables del desarrollo del cáncer. Se están haciendo verdaderos esfuerzos para utilizar la biología molecular y celular del cáncer para desarrollar nuevos avances en su tratamiento. De hecho, la primera droga de diseño eficaz en el tratamiento del cáncer humano (la droga STI-571, estudiada en el capítulo 15) fue desarrollada contra un gen muy similar al oncogén RSV.

### Referencia

Rous, P. 1911. Un sarcoma del ave de corral transmisible por un agente separable de las células tumorales. *J. Exp. Med.* 13: 397-411.



El tumor trasplantado del que fue aislado el virus del sarcoma de Rous.

han proporcionado pruebas sensibles para las investigaciones de varias actividades de las células eucariotas.

El rápido crecimiento y el pequeño tamaño de las bacterias hacen de ellas un elemento excelente para los experimentos en biología molecular, y los virus bacterianos (**bacteriófagos**) han simplificado el estudio de la genética bacteriana. Uno de los bacteriofagos más importantes es T4, que infecta y se replica en *E.*



*Figura 1.44*
**Placas de bacteriófagos.** Las placas de T4 son visibles en un tapiz de *E. coli.* Cada placa se forma por la replicación de una sola partícula del virus. (E. C. S. Chen/Visuals Unlimited.)

*coli.* La infección con una sola partícula de T4 conduce a la formación de una progenie de aproximadamente 200 partículas virales en 20-30 minutos. La célula infectada inicialmente después estalla (se lisa), liberando las partículas virales al medio, donde pueden infectar a nuevas células. En un cultivo de bacterias creciendo en un medio con agar, la replicación de T4 conduce a la formación de una zona clara de células lisadas (una placa) en una plancha o «césped» de bacterias (Fig. 1.44). Si las partículas virales infecciosas son fáciles de reproducir y de manipular, los mutantes virales —por ejemplo, virus que crecerán en una cepa de *E. coli* pero no en otra— son fáciles de aislar. Por tanto, T4 se manipula con mayor frecuencia que *E. coli* en estudios de genética molecular. Además, el genoma de T4 es 20 veces menor que el de *E. coli* —aproximadamente 0,2 millones de pares de bases— lo cual facilita el análisis genético. Otros bacteriófagos tienen incluso genomas más pequeños —el más simple consiste en moléculas de ARN de tan solo 3.600 nucleótidos—. Los virus bacterianos han proporcionado, por tanto, unos sistemas de experimentación extremadamente útiles para la genética molecular. Los estudios de estos virus son los responsables del descubrimiento de principios fundamentales de la biología molecular.

Debido al aumento de la complejidad del genoma de las células animales, los virus han sido aún más importantes en los estudios de las células animales que en los estudios de las bacterias. Muchos virus animales se replican y se estudian mediante la formación de placas en los cultivos celulares, mucho más que los bacteriofagos. Además, los genomas de los virus animales son similares en complejidad a los virus bacterianos (variando aproximadamente desde 3.000 a 300.000 pares de bases), de tal forma que los virus animales son mucho más manejables que los de sus células huésped.

Existen diversidad de virus animales, cada uno de ellos presentando ADN o ARN como material genético (Tabla 1.3). Una familia de virus animales —los **retrovirus**— contienen genomas de ARN en sus partículas virales pero sintetizan una copia de ADN de su genoma en las células infectadas. Estos virus proporcionan un buen ejemplo de la importancia de los virus como modelos, ya que los estudios de los retrovirus fueron los que demostraron la síntesis del ADN a partir de los moldes de ARN —una manera fundamental de transferencia de información genética ahora conocida en células procariotas y eucariotas. Otros ejemplos en los que los virus animales han proporcionado modelos importantes para la investigación de sus células huésped incluyen estudios de la replicación del ADN, transcripción, procesamiento del ARN, y transporte y secreción de proteínas.

Cabe destacar que la infección por algunos virus animales, en lugar de matar a la célula huésped, convierten a una célula normal en una célula cancerosa. Los estudios sobre estos virus causantes de cánceres, descritos por primera

**TABLA 1.3.** Ejemplos de virus animales

| Familia del virus | Miembro representativo | Tamaño del genoma (miles de pares de bases) |
|---|---|---|
| **Genomas ARN** | | |
| Picornavirus | Poliovirus | 7-8 |
| Togavirus | Virus de la rubéola | 12 |
| Flavivirus | Virus de la fiebre amarilla | 10 |
| Paramixovirus | Virus del sarampión | 16-20 |
| Ortomixovirus | Virus de la gripe | 14 |
| Retrovirus | Virus de la inmunodeficiencia humana | 9 |
| **Genomas ADN** | | |
| Hepadnavirus | Virus de la hepatitis B | 3,2 |
| Papovavirus | Papilomavirus humano | 5-8 |
| Adenovirus | Adenovirus | 36 |
| Herpesvirus | Virus del herpes simple | 120-200 |
| Poxvirus | Virus vaccinia | 130-280 |

vez por Peyton Rous en 1911, no solo han proporcionado las bases de nuestro actual conocimiento del cáncer a nivel molecular y celular, sino que también han conducido al descubrimiento de muchos mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales.

## RESUMEN

### ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LAS CÉLULAS

***La primera célula***: Todas las células existentes en la actualidad, procariotas y eucariotas, descienden de un único antepasado. Se cree que la primera célula apareció al menos hace 3.800 billones de años como resultado del recubrimiento del ARN, capaz de autorreplicarse, en una membrana de fosfolípidos.

**Palabras clave:** célula procariota, célula eucariota, mundo del ARN, fosfolípidos, anfipáticos, hidrofóbico, hidrofílico

***Evolución del metabolismo***: Las primeras reacciones para la creación de energía metabólica fueron en forma de glicolisis anaerobia. Después evolucionó la fotosíntesis, seguida del metabolismo oxidativo.

**Palabras clave:** adenosina 5'-trifosfato (ATP), glicolisis, fotosíntesis, metabolismo oxidativo

***Actuales procariotas***: Los actuales procariotas se encuentran divididos en dos grupos, las arquebacterias y las eubacterias, que divergen al principio de la evolución.

**Palabras clave:** arqueobacterias, eubacterias, cianobacterias, *Escherichia coli* (*E. coli*), pared celular, membrana plasmática, ribosoma

***Células eucariotas***: Las células eucariotas, que son más grandes y complejas que las células procariotas, contienen un núcleo, orgánulos citoplasmáticos, y un citoesqueleto. Se cree que han evolucionado de una asociación simbiótica de las procariotas.

**Palabras clave:** núcleo, mitocondria, cloroplasto, lisosoma, peroxisoma, vacuola, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, citoesqueleto, endosimbiosis

***Desarrollo de los organismos multicelulares***: Los eucariotas más simples son organismos unicelulares, como las levaduras y las amebas. Los organismos multicelulares evolucionaron por la asociación entre los eucariotas unicelulares, y la reproducción por división condujo al desarrollo de muchas clases de células especializadas que forman las plantas y animales del presente.

**Palabras clave:** levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, seudopodium, célula epitelial, fibroblasto, eritrocito, granulocito, monocito, macrófago, linfocito, neurona

### CÉLULAS COMO MODELOS EXPERIMENTALES

**E. coli**: Debido a su simplicidad genética y su fácil estudio, las bacterias como *E. coli* resultan particularmente útiles para la investigación de los aspectos fundamentales de la bioquímica y biología molecular.

***Levaduras***: Por ser las células eucariotas más simples, las levaduras son un modelo importante para el estudio de diversos aspectos de la biología celular eucariota.

**Dictyostelium discoideum**: El eucariota unicelular *Dictyostelium* se utiliza extensamente para el análisis experimental del movimiento celular.

**Palabras clave:** *Dictyostelium discoideum*

**Caenorhabditis elegans**: El nemátodo *C. elegans* es un organismo multicelular simple que sirve como modelo importante para la biología del desarrollo.

**Palabras clave:** *Caenorhabditis elegans*

**Drosophila melanogaster**: Debido al análisis genético tan extenso, los estudios de la mosca de la fruta *Drosophila* han conducido a avances superiores en el entendimiento del desarrollo animal.

**Palabras clave:** *Drosophila melanogaster*

**Arabidopsis thaliana**: La pequeña planta de flor *Arabidopsis* se utiliza como modelo para los estudios de la biología molecular de las plantas y su desarrollo.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*

***Vertebrados***: Muchos tipos de células de los vertebrados pueden crecer en cultivo, donde pueden ser estudiadas bajo condiciones de laboratorio controladas. Los tipos de células especializadas, como las neuronas y las células musculares, proporcionan modelos útiles para la investigación de determinados aspectos de la biología celular. La rana *Xenopus laevis* y el pez cebra son importantes modelos para el estudio del desarrollo de los primeros vertebrados, y el ratón es la especie de mamífero adecuada para el análisis genético.

**Palabras clave:** *Xenopus laevis*, pez cebra, ratón transgénico

## INSTRUMENTOS DE LA BIOLOGÍA CELULAR

***Microscopía óptica***: Se aplican diversos métodos para visualizar las células y las estructuras subcelulares y para determinar la localización intracelular de moléculas específicas usando el microscopio óptico.

**resolución, microscopia de campo luminoso, microscopía de fase-contraste, microscopía interferencia-contraste diferencial, microscopía interferencia-contraste diferencial potenciada con video, microscopía fluorescente, proteína fluorescente verde (PFV), microscopía confocal, microscopía por excitación multifotónica**

***Microscopía electrónica***: La microscopía electrónica, con una resolución aproximada cien veces mayor que la del microscopio óptico, se utiliza para analizar los detalles de la estructura celular.

**microscopía de transmisión de electrones, sombreado de metal, separación por congelación, microscopia electrónica de barrido**

***Separación subcelular***: Los orgánulos de las células eucariotas se pueden aislar para su análisis bioquímico mediante la centrifugación diferencial.

**centrifugación diferencial, ultracentrifugación, centrifugación en gradiente densidad, centrifugación por velocidad, centrifugación de equilibrio**

***Crecimiento de células animales en cultivo***: La propagación de las células animales en cultivo ha permitido el estudio de los mecanismos que controlan el crecimiento y la diferenciación.

**célula madre embrionaria, cultivo primario, línea celular**

***Cultivo de células vegetales***: Los cultivos de células vegetales se pueden diferenciar para formar tipos de células especializadas, en algunos casos, pueden regenerar plantas enteras.

**callo**

***Virus***: Los virus proporcionan modelos simples para el estudio de la función celular.

**bacteriófago, retrovirus**

## Preguntas

1. ¿Qué características fundamentales poseen todas las células vivas presentes en la Tierra? (Dar al menos tres).
2. ¿Qué demostraron los experimentos de Stanley Miller sobre la formación de moléculas orgánicas?
3. ¿Qué tipo de macromolécula es capaz de dirigir su propia autorreplicación?
4. ¿Por qué se cree que la fotosíntesis ha favorecido la evolución del metabolismo oxidativo?
5. ¿Por la formación de una membrana plasmática semipermeable en torno a un grupo de macromoléculas autorreplicantes un paso tan importante en el origen de la vida?
6. Discute las evidencias que apuntan que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron a partir de bacterias que fueron internalizadas por el precursor de las células eucariotas.
7. ¿Qué resolución se puede obtener con un microscopio óptico si la muestra se observa al aire en lugar de a través de aceite? Asume que la longitud de onda de la luz visible es 0,5 $\mu$m.
8. ¿Qué ventaja posee el uso de la proteína verde fluorescente (PFV) sobre el empleo de anticuerpos marcados con sondas fluorescentes para el estudio de la localización y movimiento de una proteína en el interior celular?
9. Identifica las distintas características de las propiedades de los orgánulos que permiten la separación por centrifugación de velocidad en un gradiente de sucrosa y centrifugación de equilibrio en un gradiente de sucrosa.
10. Las levaduras se han utilizado como modelos para el estudio de muchos aspectos de la biología de las células eucariotas. ¿Por qué no resultan un modelo apropiado para el análisis de los movimientos celulares animales?
11. ¿Por qué es importante la capacidad de cultivar células madre embrionarias?
12. Diferenciar entre cultivos de células primarias y líneas celulares inmortalizadas.

## Bibliografía


### *Origen y evolución de las células*

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Erksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140. [P]

Brocks, J. J., G. A. Logan, R. Buick and R. E. Summons. 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285: 1033-1036. [P]

Bult, C. J. and 39 others. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073. [P]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4360-4363. [P]

Crick, F. H. C. 1968. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38: 367-379. [P]

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271-1275. [P] Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124-2128. [R]

Gesteland, R. F., T. R. Cech and J. F., Atkins (eds.). 1999. *The RNA World*. 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gilbert, W. 1986. The RNA world. *Nature* 319: 618. [R]

Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel. 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* 292: 1319-1325. [P]

Joyce, G. F. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338: 217-224. [R]

Kasting, J. F. and J. L. Siefert. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296: 1066-1068. [R]

Knoll, A. H. 1992. The early evolution of eukaryotes: A geological perspective. *Science* 256: 622-627. [R]

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman. Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117: 528-529. [P]

Mojzsis, S. J., G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman and C. R. L. Friend. 1996. Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* 384: 55-59. [P]

Orgel, L. E. 1998. The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem. Sci.* 23: 491-495. [R]

Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740. [R]

Shixing, Z. and C. Huineng. 1995. Megascopic multicellular organisms from the 1700million-year-old Tuanshanzi formation in the Jixian area, north China. *Science* 270: 620-622. [P]

Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579. [P]

### *Células como modelos experimentales*

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melano gaster*. *Science* 287: 2185-2195. [P]

Blattner, F. R., G. Plunkett III., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462. [P]

Botstein, D., S. A. Chervitz and J. M. Cherry. 1997. Yeast as a model organism. *Science* 277: 1259-1260. [R]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567. [P]

Hamilton, B .A. and W. N. Frankel. 2001. Of mice and genome sequence. *Cell* 107: 13-16. [R]

Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini and E. Lacey. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo*. 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Maliga, P., D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner (eds.). 1995. *Methods in Plant Molecular Biology*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Meyerowitz, E. M. 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482-1485. [R]

Neidhardt, F. C., R. Curtiss III., J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low Jr., B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds.). 1996. Escherichia coli *and* Salmonella*: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press. Sive, H. L., R. M. Grainger and R. M. Harland (eds.). 1999. *Early Development of* Xenopus laevis*: A Course Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018. [P]

Thisse, C. and L. I. Zon. 2002. Organogenesis—heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 295: 457-462. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351. [P]

### *Instrumentos de la biología molecular*

Bowers, W. E. 1998. Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* 8: 330-333 [R]

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 1992. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chalfie, M. 1995. Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 62: 651-656. [R]

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433-435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186-194. [R]

Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 235: 442-447. [P]

Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 1999. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, DC: ASM Press.

Graham, J. and D. Rickwood (ed.). 1997. *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.

Kam, Z., E. Zamir and B. Geiger. 2001. Probing molecular processes in live cells by quantitative multidimensional microscopy. *Trends Cell Biol.* 11: 329-334. [R]

Lacey, A. J. (ed.) 1999. *Light Microscopy in Biology: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358. [R]

Piston, D. W. 1999. Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol.* 9: 66-69 [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81: 233-246. [P]

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397-411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154-158. [R]

Spector, D. L., R. Goldman and L. Leinwand. 1998. *Cells: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tsien, R. Y. and A Miyawaki. 1998. Seeing the machinery of live cells. *Science* 280: 1954-1955. [R]

# 2 Química celular



LAS CÉLULAS SON ESTRUCTURAS INCREÍBLEMENTE COMPLEJAS Y VARIADAS, capaces no sólo de auto-replicarse —la propia esencia de la vida— sino también de realizar una amplia gama de tareas especializadas en organismos pluricelulares. Sin embargo, las células siguen las mismas leyes de la química y la física que determinan el comportamiento de los sistemas inertes. En consecuencia, la biología molecular moderna trata de entender los procesos moleculares en términos de reacciones físicas y químicas.

Este capítulo trata los principios fundamentales de la química biológica que gobiernan la vida de las células. No pretende ni ser un tratado extenso sobre bioquímica ni describir todas las reacciones metabólicas de las células. Más bien, el capítulo se centrará en cinco temas principales: tipos de moléculas dentro de las células, papel central de las proteínas como catalizadores biológicos, generación y utilización de energía metabólica, biosíntesis de los principales componentes celulares y estructura de las membranas biológicas. La comprensión de estos fundamentos químicos constituye la base para entender los distintos aspectos de la estructura y función celulares que se tratarán en este texto.

## Composición molecular de las células

Las células están compuestas de agua, iones inorgánicos y moléculas que contienen carbono (orgánicas). El agua es la molécula más abundante en las células, representando el 70 % o más de la masa celular total. En consecuencia, las interacciones entre el agua y el resto de los componentes celulares tienen una importancia central en la química biológica. La propiedad crítica del agua al respecto es que es una molécula polar, donde los átomos de hidrógeno poseen una carga ligeramente positiva y el oxígeno posee una carga ligeramente negativa (Fig. 2.1). Debido a su naturaleza polar, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno entre sí o con otras moléculas polares, así como interaccionar con iones cargados positiva o negativamente. Como resultado de estas interacciones, los iones y las moléculas polares son fácilmente solubles en agua (hidrófilas). Por el contrario, las moléculas no polares, que no pueden interaccionar con el agua, son escasamente solubles en un medio acuoso (hidrófobas). En consecuencia, las moléculas no polares tienden a minimizar su contacto con el agua relacionándose estrechamente entre sí. Como se trata más adelante en este capítulo, las interacciones de moléculas polares y no polares con el agua y entre sí desempeñan papeles cruciales en la formación de estructuras biológicas, como las membranas celulares.

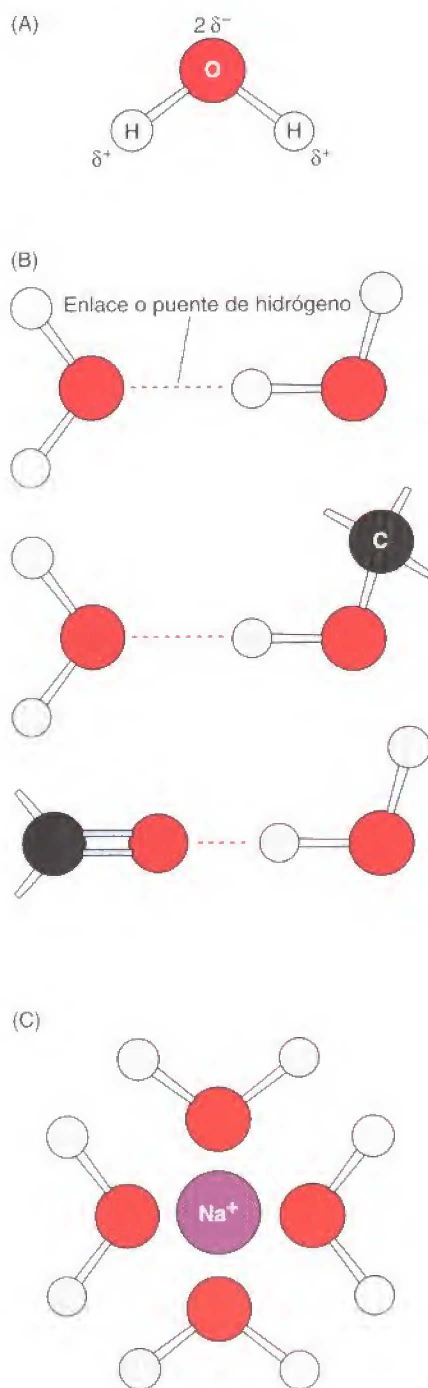



*Figura 2.1*
**Características del agua.** (A) El agua es una molécula polar, con una carga ligeramente negativa ($\delta^-$) en el átomo de oxígeno y una carga ligeramente positiva ($\delta^+$) en los átomos de hidrógeno. Debido a esta polaridad, las moléculas de agua pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) bien entre sí o con otras moléculas polares (B), además de interaccionar con iones cargados (C).

Los iones inorgánicos de la célula, incluyendo el sodio ($Na^+$), potasio ($K^+$), magnesio ($Mg^{2+}$), calcio ($Ca^{2+}$), fosfato ($HPO_4^{2-}$), cloro ($Cl^-$) y bicarbonato ($HCO_3^-$), constituyen un 1 % o menos de la masa celular total. Estos iones están implicados en numerosos aspectos del metabolismo celular, y de este modo, desempeñan importantes papeles en la función celular.

Sin embargo, las moléculas orgánicas son los únicos componentes característicos de las células. La mayoría de estos componentes orgánicos pertenecen a una de cuatro clases de moléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas, los ácidos nucleicos, y la mayoría de los carbohidratos (polisacáridos) son macromoléculas formadas por la unión (polimerización) de cientos o miles de precursores de bajo peso molecular: aminoácidos, nucleótidos o azúcares simples, respectivamente. Dichas macromoléculas constituyen entre el 80 % y 90 % del peso en seco de la mayoría de las células. Los lípidos son el otro constituyente principal de las células. El resto de la masa celular se compone de una variedad de pequeñas moléculas, incluyendo los precursores macromoleculares. La química básica de las células puede así entenderse en términos de las estructuras y funciones de cuatro tipos principales de macromoléculas orgánicas.

## *Carbohidratos*

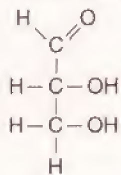
Los **carbohidratos** incluyen a los azúcares simples y a los polisacáridos. Estos azúcares simples, como la glucosa, son los nutrientes principales de las células. Como se trata más adelante en este capítulo, su degradación proporciona no solo la fuente de energía celular sino el material inicial para la síntesis de otros componentes celulares. Los polisacáridos son formas de reserva de los azúcares y constituyen componentes estructurales de la célula. Además, los polisacáridos y polímeros más cortos de azúcares actúan como marcadores para una variedad de procesos de reconocimiento celular, incluyendo la adhesión entre células y el transporte de proteínas a los destinos intercelulares apropiados.

La estructura de los azúcares simples (**monosacáridos**) más representativa aparece en la Figura 2.2. La fórmula básica de estas moléculas es $(CH_2O)_n$, a partir de la cual procede el nombre de carbohidrato (C = «carbo» y $H_2O$ = «hidrato»). El azúcar de seis átomos de carbono ($n = 6$), la glucosa, es especialmente importante en las células, ya que proporciona la principal fuente de energía celular. Otros azúcares simples tienen entre tres y siete átomos de carbono, siendo los azúcares de tres y cinco carbonos los más comunes. Los azúcares que contienen cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar estructuras anulares, que constituyen las formas predominantes de estas moléculas dentro de las células. Como se refleja en la Figura 2.2, los azúcares ciclados existen en dos formas alternativas (llamadas $\alpha$ o $\beta$), dependiendo de la configuración del carbono 1.

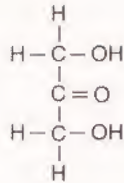
Los monosacáridos pueden unirse entre sí mediante reacciones de deshidratación, donde se extrae $H_2O$ y se unen los azúcares mediante un **enlace glicosídico** o **glucosídico** entre dos de sus átomos de carbono (Fig. 2.3). Si sólo se unen unos pocos azúcares, el polímero resultante se denomina **oligosacárido**. Si se implican un número elevado (cientos o miles) de azúcares, los polímeros resultantes son macromoléculas denominadas **polisacáridos**.

Los dos polisacáridos comunes —**glucógeno** y **almidón**— son las formas de depósito de carbohidratos en las células de animales y plantas respectiva-

**Triosas ($C_3H_6O_3$)**

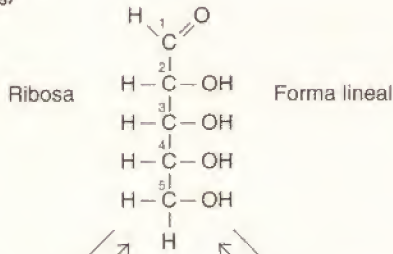



Gliceraldehido



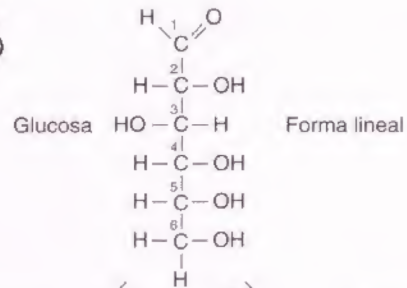

Dihidroxiacetona

**Pentosas ($C_5H_{10}O_5$)**










Forma lineal

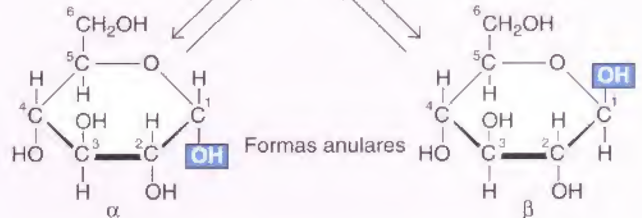



*Figura 2.2*

**Estructura de los azúcares simples.** Se ilustran los azúcares simples más representativos con tres, cinco y seis átomos de carbono (triosas, pentosas y hexosas respectivamente). Los azúcares con cinco o más átomos de carbono pueden ciclarse para formar anillos, que existen en dos formas alternativas (llamadas $\alpha$ o $\beta$), dependiendo de la configuración del carbono 1.

mente. Tanto el glucógeno como el almidón están compuestos completamente de moléculas de glucosa en la configuración $\alpha$ (Fig. 2.4). El enlace principal se establece entre el carbono 1 de una glucosa y el carbono 4 de una segunda glucosa. Además, tanto el glucógeno como una forma de almidón (amilopectina) contienen enlaces ocasionales $\alpha$ (1→6), en los que el carbono 1 de una glucosa se une al carbono 6 de una segunda glucosa. Como se ve en la Figura 2.4, estos enlaces conllevan a la formación de ramificaciones que resultan de la unión de dos cadenas independientes de enlaces $\alpha$ (1→4). Estas ramificaciones están presentes en el glucógeno y la amilopectina, aunque otra forma de almidón (amilosa) es una molécula sin ramificaciones.

De este modo, las estructuras del glucógeno y del almidón son similares básicamente, como lo es su función: almacenar glucosa. La **celulosa**, en contraste, tiene una función bien definida como principal componente estructural de la pared de las células de las plantas. Quizás sorprendentemente, por lo tanto, la celulosa también se compone enteramente de moléculas de glucosa. Los residuos de glucosa de la celulosa, sin embargo, presentan una configuración $\beta$ en vez de $\alpha$, y la celulosa es un polisacárido no ramificado (véase Fig. 2.4). La unión de los residuos de glucosa por medio de enlaces $\beta$(1→4) en lugar de $\alpha$(1→4)

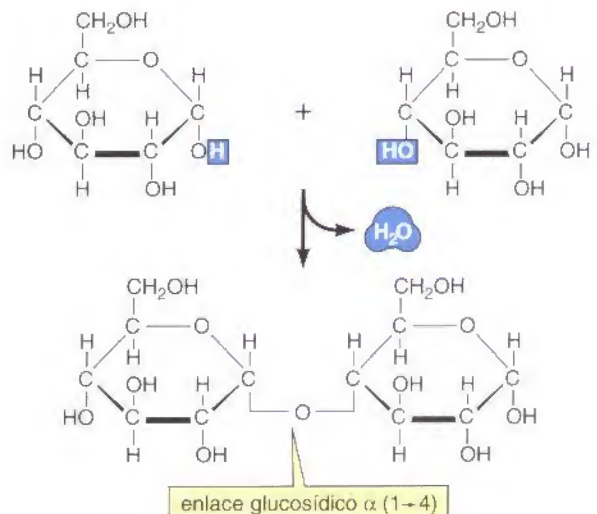



*Figura 2.3*

**Formación de un enlace glucosídico.** Dos azúcares simples se unen mediante una reacción de deshidratación (una reacción en la que se extrae agua). En el ejemplo ilustrado, dos moléculas de glucosa en la configuración $\alpha$ se unen mediante un enlace entre los carbonos 1 y 4, que por ello recibe el nombre de enlace glucosídico $\alpha$ (1→4).

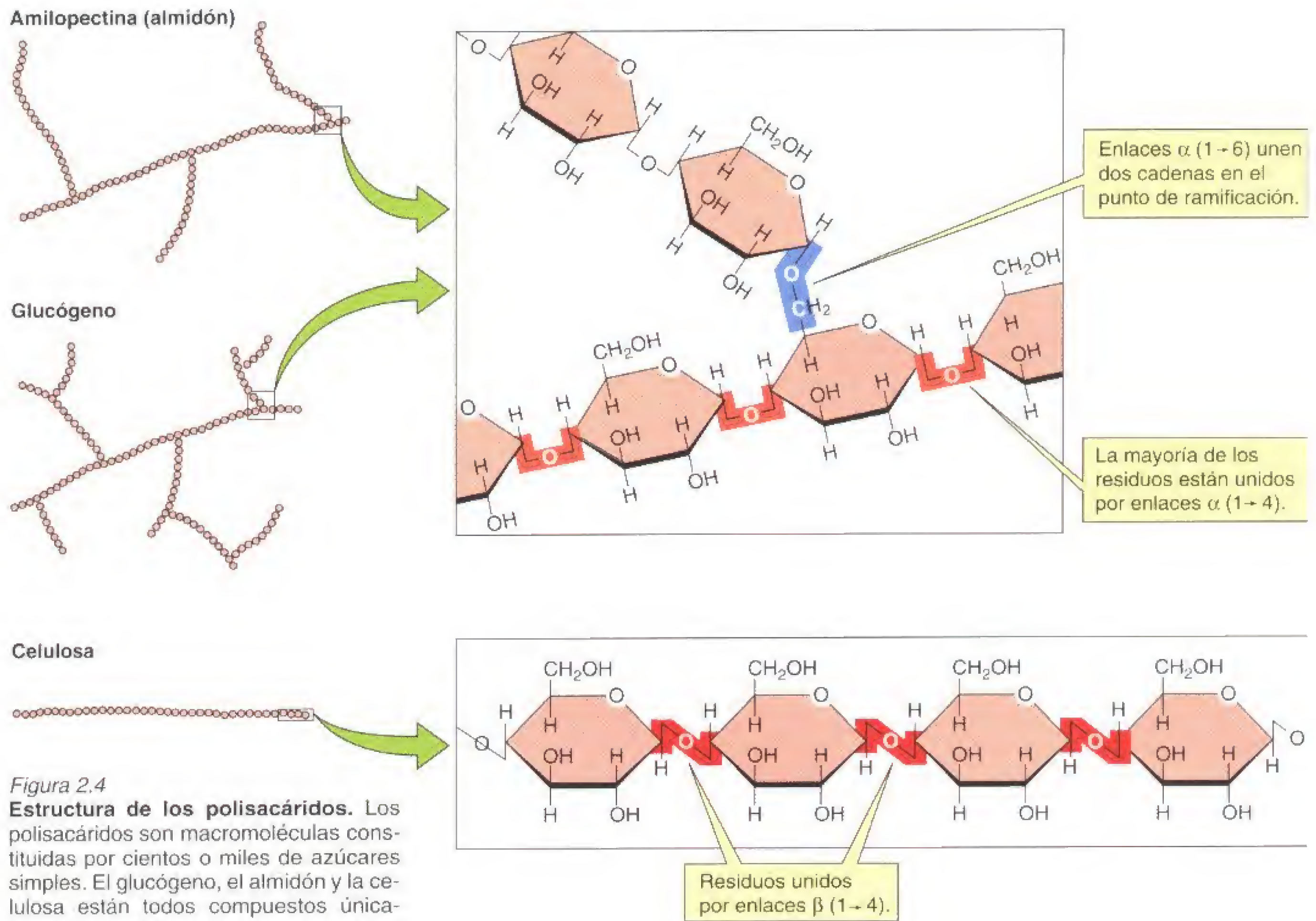



*Figura 2.4*
**Estructura de los polisacáridos.** Los polisacáridos son macromoléculas constituidas por cientos o miles de azúcares simples. El glucógeno, el almidón y la celulosa están todos compuestos únicamente por residuos de glucosa, que están unidos por enlaces glucosídicos α (1→4) en el glucógeno y el almidón, pero por enlaces β (1→4) en la celulosa. El glucógeno y una forma de almidón (amilopectina) también presentan ocasionalmente enlaces α (1→6), que sirven como puntos de ramificación al unir dos cadenas independientes α (1→4).

hace que la celulosa forme largas cadenas lineales que se empaquetan una junto a otra para formar fibras con gran fuerza mecánica.

Además de sus papeles en el almacenamiento de energía y en la estructura celular, los oligosacáridos y los polisacáridos son importantes en una variedad de procesos de señalización celular. Por ejemplo, los oligosacáridos se encuentran frecuentemente ligados a proteínas, donde funcionan como marcadores para dirigir las proteínas a la superficie celular o para incorporarlas a distintas organelas subcelulares. Los oligosacáridos y los polisacáridos también funcionan como marcadores en la superficie celular, desempeñando importantes papeles en el reconocimiento celular y en las interacciones entre células en los tejidos de los organismos pluricelulares.

## *Lípidos*

Los **lípidos** desempeñan tres funciones básicas en las células. Primero, proporcionan una importante fuente de energía. Después, y de gran importancia en la biología celular, los lípidos son el componente principal de las membranas celulares. Y por último, los lípidos desempeñan importantes papeles en la señalización celular, bien como hormonas esteroideas (p. ej., estrógeno y testosterona), o como mensajeros moleculares que trasladan señales desde los receptores de la superficie celular hasta dianas dentro de la célula.

Los lípidos más simples son los **ácidos grasos**, consistentes en largas cadenas hidrocarbonadas, que con mayor frecuencia contienen 16 o 18 átomos de carbono, con un grupo carboxilo ($COO^-$) en un extremo (Fig. 2.5). Los ácidos

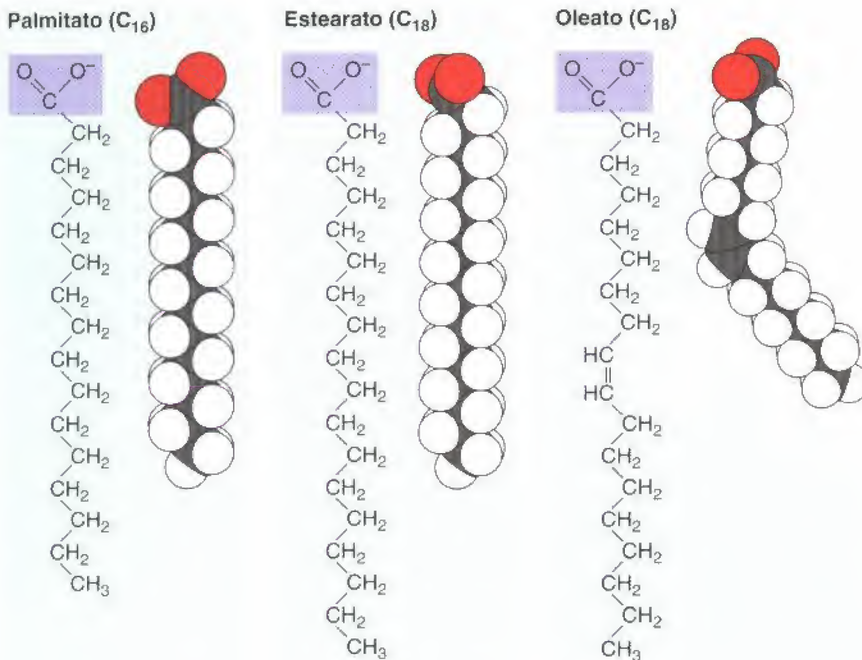
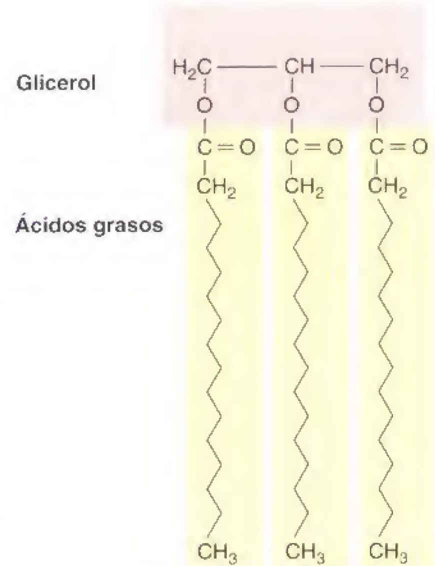



*Figura 2.5*
**Estructura de los ácidos grasos.** Los ácidos grasos consisten en largas cadenas hidrocarbonadas que terminan en un grupo carboxilo ($COO^-$). El palmitato y el estearato son ácidos grasos saturados que constan de 16 y 18 átomos de carbono respectivamente. El oleato es un ácido graso insaturado de 18 carbonos que contiene un doble enlace entre los carbonos 9 y 10. Observen que el doble enlace produce un acodamiento en la cadena hidrocarbonada.

grasos no saturados contienen uno o más dobles enlaces entre átomos de carbono; en los ácidos grasos saturados todos los átomos de carbono están enlazados al máximo número de átomos de hidrógeno posible. Las cadenas hidrocarbonadas largas de ácidos grasos contienen sólo enlaces C-H no polares, que son incapaces de interaccionar con el agua. La naturaleza hidrófoba de estas cadenas de ácidos grasos es responsable de buena parte del comportamiento de los lípidos complejos, particularmente en la formación de las membranas biológicas.

Los ácidos grasos se almacenan en forma de **triglicéridos**, o **grasas**, que consisten en tres ácidos grasos ligados a una molécula de glicerol (Fig. 2.6). Los triglicéridos son insolubles en agua y por lo tanto, se acumulan como gotas de grasa en el citoplasma. Cuando es necesario, pueden ser degradados para su utilización como moléculas procuradoras de energía que se tratan más adelante en este capítulo. Es de destacar que los ácidos grasos son una forma de almacenamiento de energía más eficaz que los carbohidratos, produciendo más del doble de energía por peso de material degradado. Las grasas, por lo tanto, permiten que se almacene energía en menos de la mitad del peso corporal que se requeriría para almacenar la misma cantidad de energía en carbohidratos —una consideración particularmente importante para los animales debido a su movilidad.

Los **fosfolípidos**, los principales componentes de las membranas celulares, se componen de dos ácidos grasos unidos a un grupo polar de cabeza (Fig. 2.7). En los fosfoglicéridos, los dos ácidos grasos están ligados a átomos de carbono del glicerol, como en los triglicéridos. El tercer carbono del glicerol, sin embargo, está ligado a un grupo fosfato, que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña, como la colina, la serina, el inositol o la etanolamina. La **esfingomielina**, el único fosfolípido no glicérico de las membranas celulares, contiene dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo po-



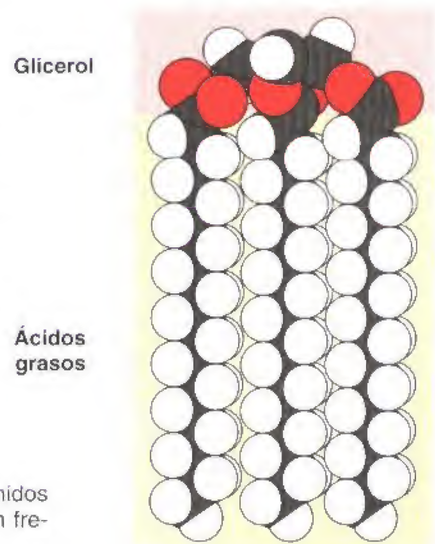
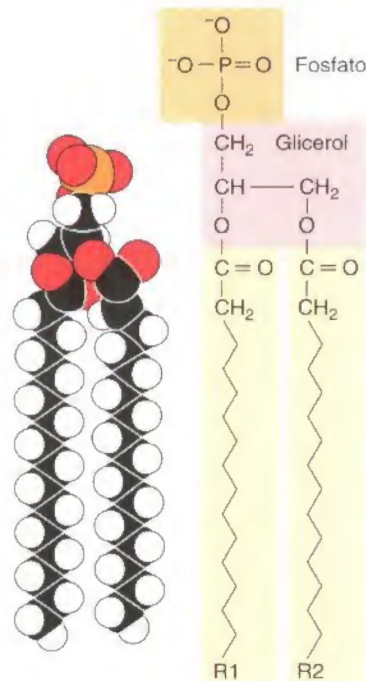
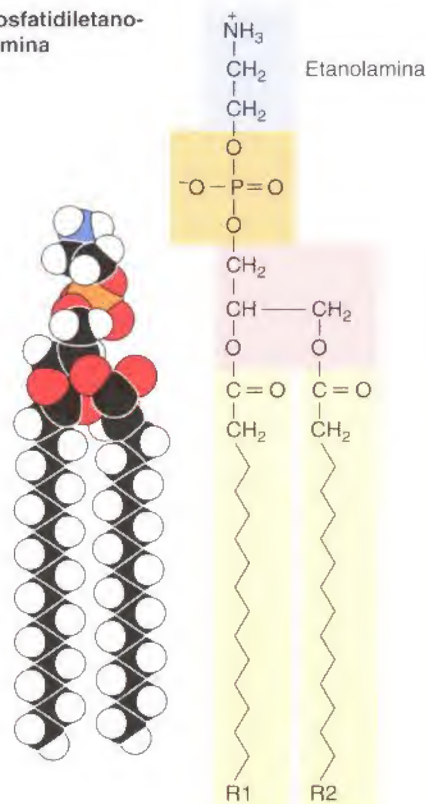
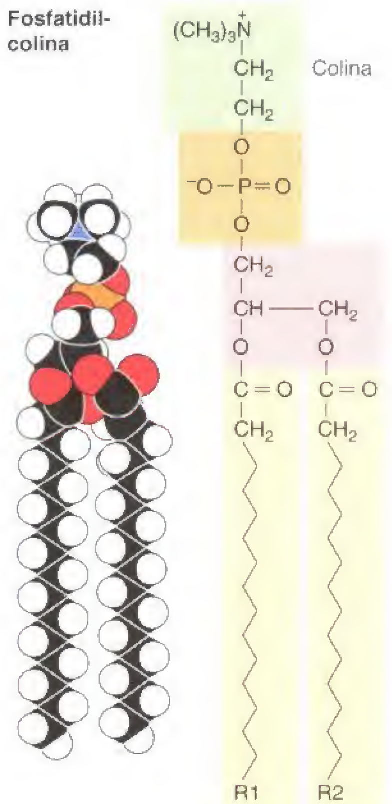
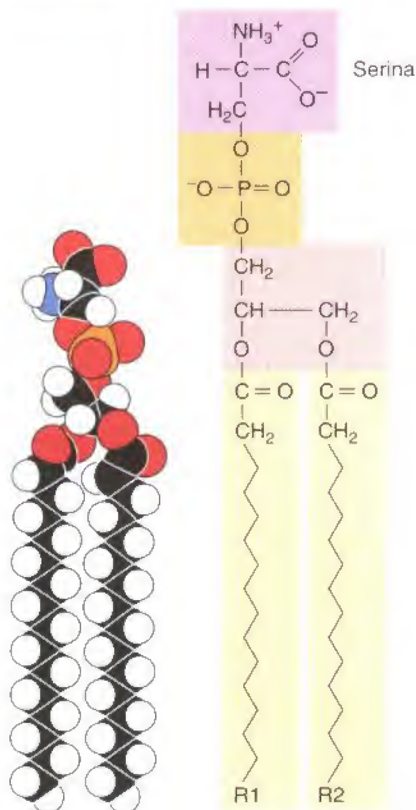



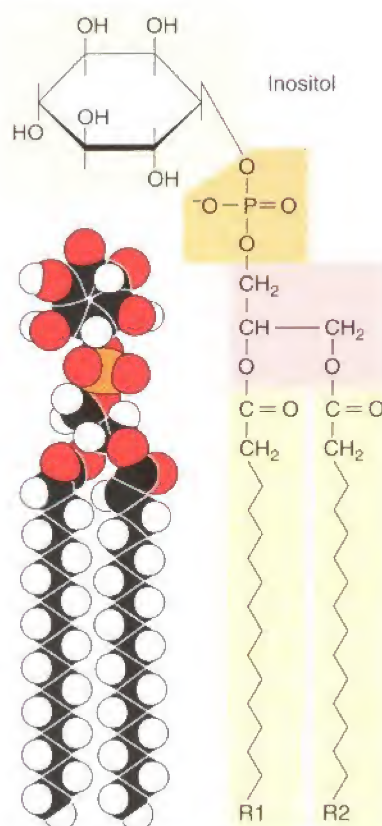

*Figura 2.6*
**Estructura de los triglicéridos.** Los triglicéridos (grasas) contienen tres ácidos grasos unidos a glicerol. En este ejemplo, los tres ácidos grasos son palmitato, pero los triglicéridos con frecuencia contienen una mezcla de distintos ácidos grasos.


Ácido fosfatídico
Fosfato
Glicerol
R1
R2


Fosfatidiletanolamina
Etanolamina
R1
R2


Fosfatidilcolina
Colina
R1
R2


Fosfatidilserina
Serina
R1
R2


Fosfatidilinositol
Inositol
R1
R2

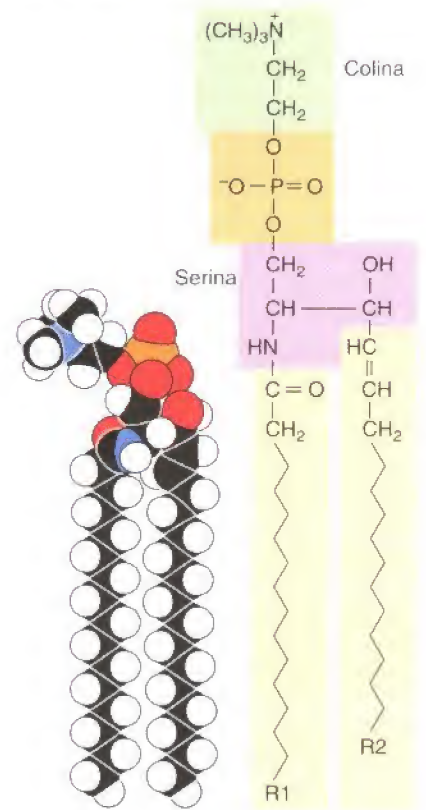

Esfingomielina
Colina
Serina
R1
R2

*Figura 2.7*
**Estructura de los fosfolípidos.** Los fosfoglicéridos contienen dos ácidos grasos unidos al glicerol. Los ácidos grasos pueden ser diferentes entre sí y se designan R1 y R2. El tercer carbono del glicerol está ligado a un grupo fosfato (formando ácido fosfatídico), que a su vez está frecuentemente unido a otra molécula polar pequeña (formando fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, o fosfatidilinositol). En la esfingomielina dos cadenas hidrocarbonadas se unen a un grupo polar de cabeza formado por serina en vez de glicerol.

lar de cabeza formado por serina en vez de glicerol. Todos los fosfolípidos tienen colas hidrófobas, consistentes en las dos cadenas hidrocarbonadas, y grupos hidrófilos de cabeza, consistentes en el grupo fosfato y sus uniones polares. Consecuentemente, los fosfolípidos son moléculas **anfipáticas**, en parte solubles en agua y en parte insolubles. Esta propiedad de los fosfolípidos es la base para la formación de membranas biológicas, como ya se detalla más adelante en este capítulo.

Además de los fosfolípidos, muchas membranas celulares contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se componen de dos cadenas hidrocarbonadas ligadas a grupos polares de cabeza que contienen carbohidratos (Fig. 2.8). Son de esta forma similares a los fosfolípidos en su organización general como moléculas anfipáticas. El colesterol, por el contrario, consta de cuatro anillos hidrocarbonados en vez de cadenas lineales hidrocarbonadas (Fig. 2.9). Los anillos hidrocarbonados son intensamente hidrófobos, pero el grupo hidroxilo (OH) unido a un extremo del colesterol es débilmente hidrófilo, así que el colesterol también es anfipático.

Además de su papel como componentes de membranas celulares, los lípidos funcionan como moléculas de señalización, tanto dentro como fuera de las células. Las **hormonas esteroideas** (como los estrógenos y la testosterona) son derivados del colesterol (véase Fig. 2.9). Las hormonas son un grupo variado de mensajeros químicos, todos ellos contienen cuatro anillos hidrocarbonados a los que se unen grupos funcionales específicos. Los derivados de los fosfolípidos también funcionan como mensajeros celulares dentro de las células, actuando para transmitir señales desde los receptores de la superficie celular hasta sus dianas intracelulares, que regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, el movimiento, la supervivencia y la diferenciación (véase Cap. 13).

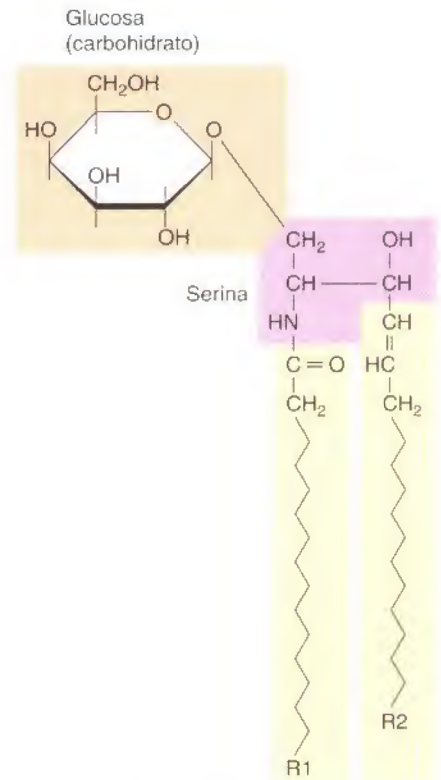



*Figura 2.8*
**Estructura de los glicolípidos.** Dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo polar de cabeza formado por serina y que contienen carbohidratos (p. ej., glucosa).

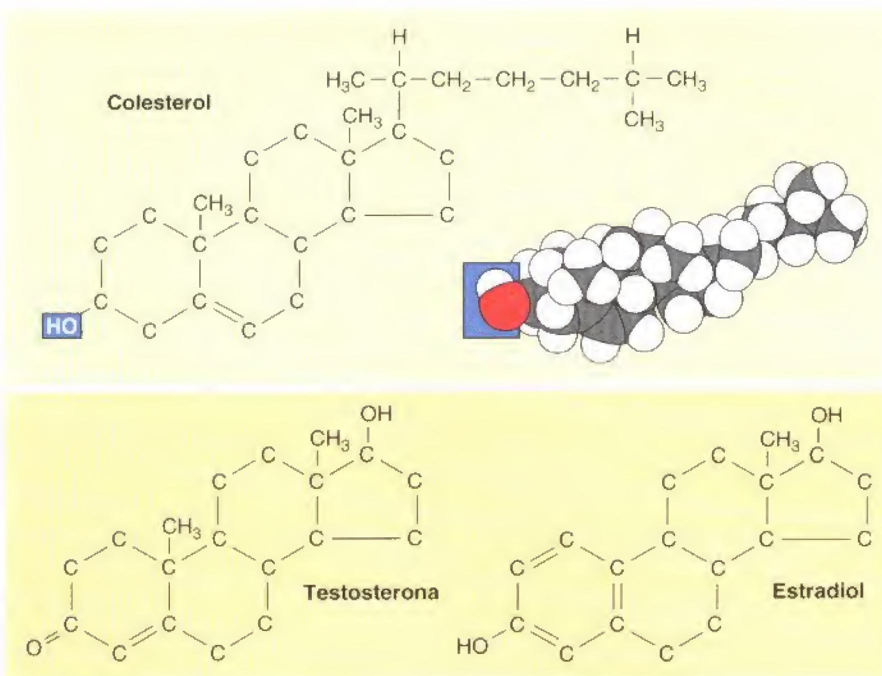
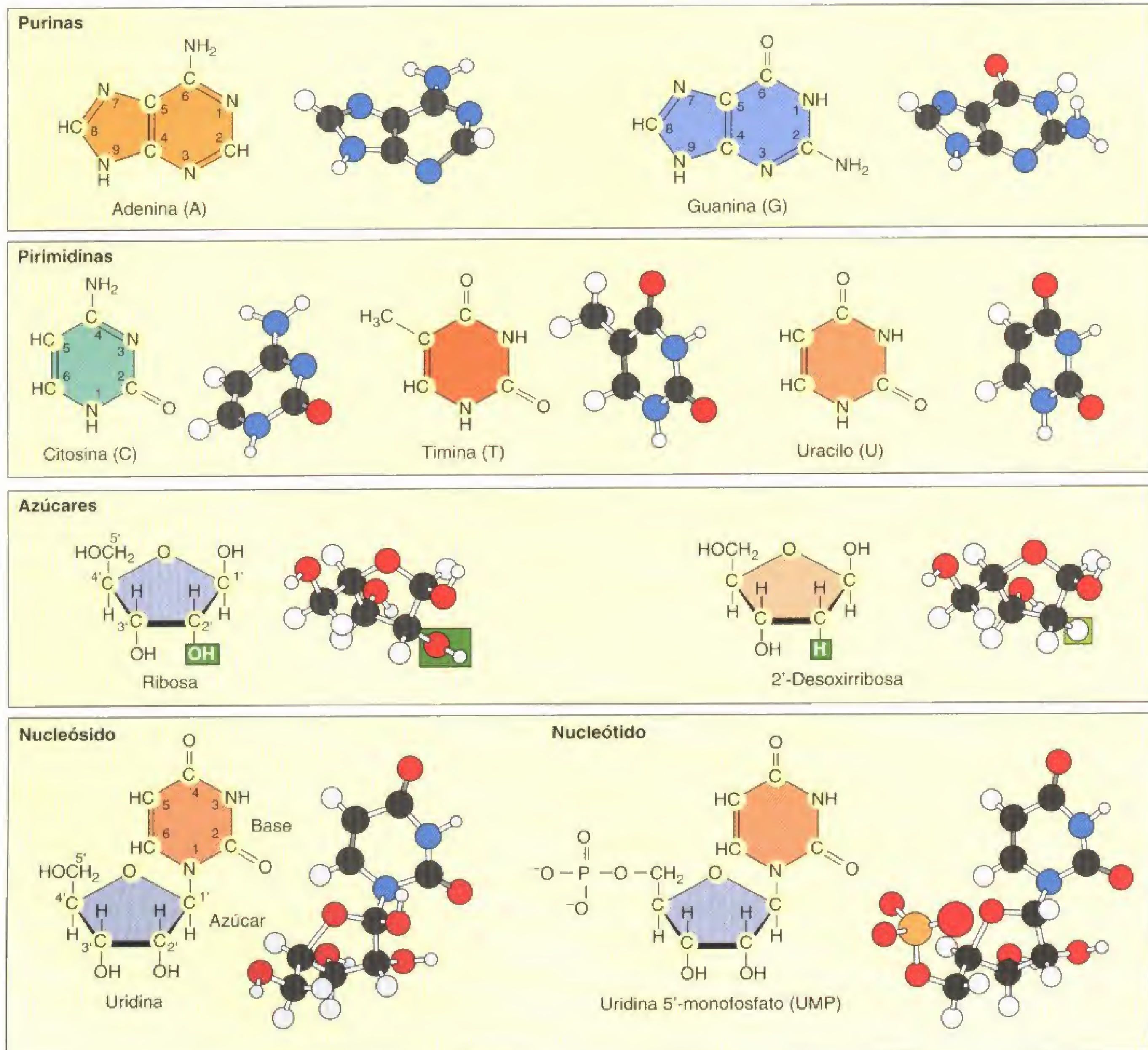



*Figura 2.9*
**Colesterol y hormonas esteroideas.** El colesterol, un importante componente de las membranas celulares, es una molécula anfipática debido a su grupo polar hidroxilo. El colesterol también es un precursor de las hormonas esteroideas, como la testosterona y el estradiol (un tipo de estrógeno). Los átomos de carbono ligados a los anillos de carbono no están representados en esta figura.

## Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos —ADN y ARN— son las principales moléculas de información de la célula. El **ácido desoxirribonucléico (ADN)** desempeña un papel único como material genético, que en las células eucariotas se encuentra en el núcleo. Distintos tipos de **ácido ribonucléico (ARN)** participan en distintas actividades celulares. El **ARN mensajero (ARNm)** transporta información desde el ADN a los ribosomas, donde sirve como molde para la síntesis de proteínas. Otros dos tipos de ARN **(ARN ribosómico** y **ARN de transferencia)** están implicados en la síntesis de proteínas. Además otras formas de ARN están implicadas en el procesamiento y transporte tanto del ARN como de proteínas. Además de actuar como una molécula informativa, el ARN también es capaz de catalizar diversas reacciones químicas. En las células actuales, estas incluyen reacciones implicadas tanto en la síntesis proteica como en el procesamiento del ARN.

*Figura 2.10*
**Componentes de los ácidos nucleicos.** Los ácidos nucleicos contienen bases purínicas y pirimidínicas ligadas a azúcares fosforilados. Una base de un ácido nucleico ligada sólo a un azúcar es un nucleósido. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato.



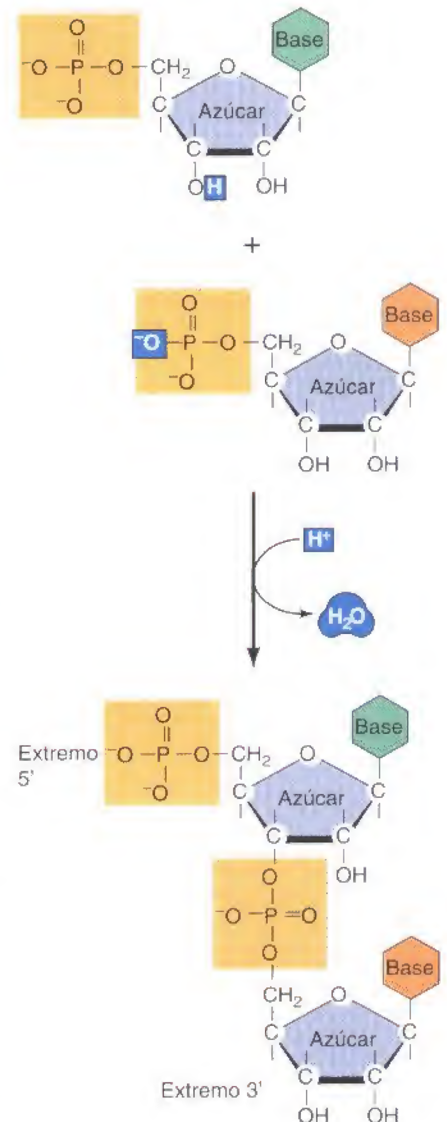



*Figura 2.11*
**Polimerización de los nucleótidos.** Un enlace fosfodiéster se forma entre el grupo 3' hidroxilo de un nucleótido y el grupo 5' fosfato de otro. Una cadena polinucleótida tiene un sentido con un extremo terminando en un grupo 5' fosfato (el extremo 5') y el otro en un grupo 3' hidroxilo (el extremo 3').

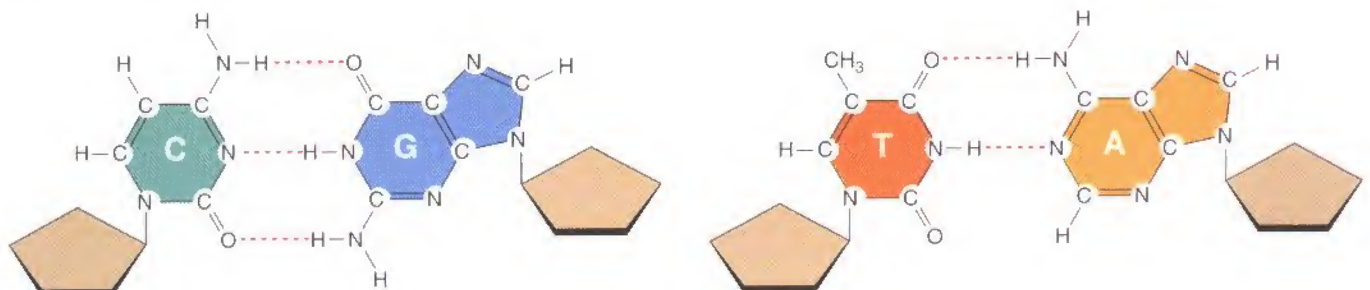
El ADN y el ARN son polímeros de **nucleótidos**, que consisten en bases de **purina** y **pirimidina** ligadas a azúcares fosforilados (Fig. 2.10). El ADN contiene dos purinas (**adenina** y **guanina**) y dos pirimidinas (**citosina** y **timina**). Adenina, guanina y citosina también están presentes en el ARN, pero el ARN contiene **uracilo** en lugar de timina. Las bases están ligadas a azúcares (**2'-desoxirribosa** en el ADN, o **ribosa** en el ARN) para formar **nucleósidos**. Los nucleótidos además contienen uno o más grupos fosfato ligados al carbono 5' de los azúcares de los nucleósidos.

La polimerización de nucleótidos para formar ácidos nucleicos implica la formación de **enlaces fosfodiéster** entre el 5' fosfato de un nucleótido y el 3' hidroxilo de otro (Fig. 2.11). Los **oligonucleótidos** son pequeños polímeros que contienen sólo unos pocos nucleótidos; los **polinucleótidos** mayores que componen el ARN y ADN celular pueden contener miles o millones de nucleótidos respectivamente. Es importante señalar que una cadena polinucleotídica tiene un sentido, con un extremo de la cadena terminando en un grupo 5' fosfato y el otro en un grupo 3' hidroxilo. Los polinucleótidos siempre se sintetizan en la dirección 5' a 3', añadiéndose un nucleótido libre al grupo 3' OH de la cadena en formación. Por convención, la secuencia de bases en el ADN o ARN también se escribe en la dirección 5' a 3'.

La información del ADN y del ARN se transmite por el orden de las bases en la cadena polinucleotídica. El ADN es una molécula de doble hebra que consiste en dos cadenas de polinucleótidos que discurren en direcciones opuestas (véase Cap. 3). Las bases se encuentran en la parte interna de la molécula, y las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. La adenina se aparea con la timina y la guanina con la citosina (Fig. 2.12). La principal consecuencia de este emparejamiento complementario es que una hebra de ADN (o de ARN) puede actuar como molde para dirigir la síntesis de una cadena complementaria. Los ácidos nucleicos son por lo tanto excepcionalmente capaces de dirigir su propia auto-replicación, permitiéndoles funcionar como las moléculas de información fundamentales de la célula. La información transportada por el ADN y el ARN dirige la síntesis de proteínas específicas, que controlan la mayoría de la actividad celular.

Los nucleótidos no sólo son importantes como los ladrillos de construcción de los ácidos nucleicos; también desempeñan papeles vitales en otros proce-

*Figura 2.12*
**Emparejamiento complementario entre bases del ácido nucleico.** La formación de enlaces de hidrógeno entre bases en hebras opuestas de ADN conduce al apareamiento específico de guanina (G) con citosina (C) y de adenina (A) con la timina (T).



sos celulares. Quizás el ejemplo más destacado es el adenosín 5' trifosfato (ATP), que es la principal forma de energía química dentro de las células. Otros nucleótidos funcionan de manera similar como transportadores de energía o de grupos químicos reactivos en una gran variedad de reacciones metabólicas. Además, algunos nucleótidos (p. ej., AMP cíclico) son importantes moléculas de señalización dentro de las células (véase Cap. 13).

## *Proteínas*

Mientras que los ácidos nucleicos transportan la información genética de la célula, la responsabilidad básica de las **proteínas** es ejecutar las tareas dirigidas por esa información. Las proteínas son las más variadas de todas las macromoléculas, y cada célula contiene varios miles de proteínas diferentes, que realizan una amplia gama de funciones. Los papeles de las proteínas incluyen servir como componentes estructurales de células y tejidos, actuar en el transporte y almacenamiento de pequeñas moléculas (p. ej., , en el transporte de oxígeno por la hemoglobina), transmitir información entre células (p. ej., hormonas proteicas), y proporcionar una defensa frente a la infección (p. ej., anticuerpos). La propiedad fundamental de las proteínas, sin embargo, es su capacidad para actuar como enzimas, que, como se trata en la siguiente sección, catalizan casi todas las reacciones químicas en los sistemas biológicos. De este modo, las proteínas dirigen virtualmente todas las actividades de la célula. La importancia central de las proteínas en la química biológica viene determinada por su nombre, derivado de la palabra griega *proteios*, que significa «de primer rango».

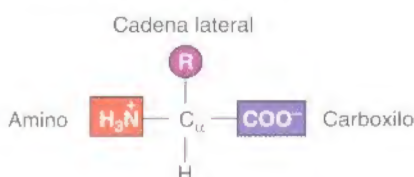
Las proteínas son polímeros de 20 **aminoácidos** distintos. Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono (llamado carbono $\alpha$) ligado a un grupo carboxilo ($COO^-$), un grupo amino ($NH_3^+$), un átomo de hidrógeno, y una cadena lateral característica (Fig. 2.13). Las propiedades químicas específicas de las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos determinan los papeles de cada aminoácido en la estructura y función proteica.

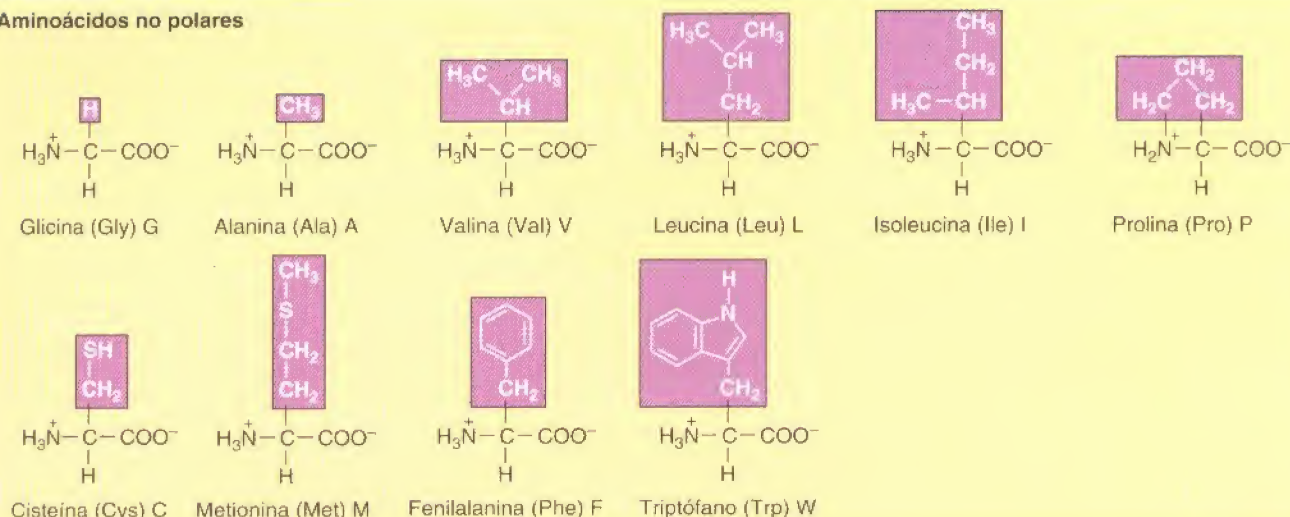
Los aminoácidos pueden agruparse en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales (Fig. 2.14). Diez aminoácidos tienen cadenas laterales no polares que no interaccionan con el agua. La glicina es el aminoácido más simple, con una cadena lateral consistente en un sólo átomo de hidrógeno. La alanina, valina, leucina e isoleucina tienen cadenas laterales hidrocarbonadas compuestas por hasta cuatro átomos de carbono. Las cadenas laterales de estos aminoácidos son hidrófobas y de ahí que tiendan a localizarse en el interior de las proteínas, donde no se encuentran en contacto con el agua. Igualmente, la prolina tiene una cadena lateral hidrocarbonada, pero es la única que en su cadena lateral está ligada al nitrógeno del grupo amino así como al carbono $\alpha$, formando una estructura cíclica. Las cadenas laterales de dos aminoácidos, cisteína y metionina, contienen átomos de azufre. La metionina es bastante hidrófoba, pero la cisteína lo es menos debido a su grupo sulfhidrilo (SH). Como se trata más adelante, el grupo sulfhidrilo de la cisteína desempeña un importante papel en la estructura proteica porque se pueden formar enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de distintos residuos de cisteína. Finalmente, dos aminoácidos no polares, fenilalanina y triptófano, tienen cadenas laterales que contienen anillos aromáticos muy hidrófobos.

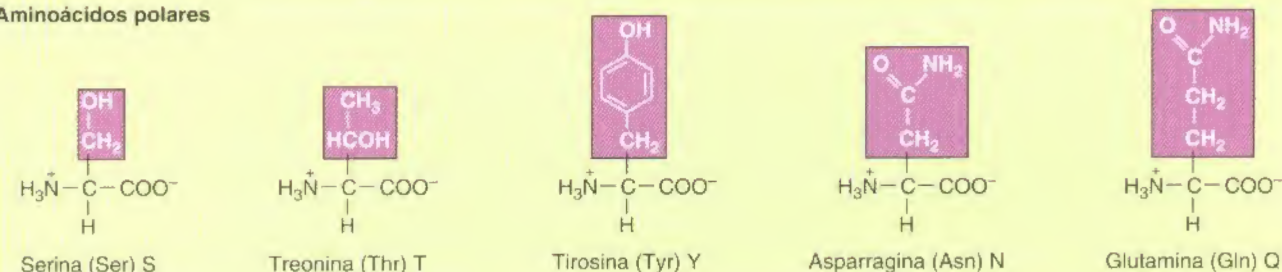
Cinco aminoácidos tienen cadenas laterales sin carga pero polares. Estos incluyen la serina, la treonina y la tirosina, que tienen grupos hidroxilo en sus cadenas laterales, así como la asparragina y la glutamina, que tiene grupos amida ($O{=}C{-}NH_2$) polares. Debido a que las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, estos aminoácidos son hidrófobos y tienden a localizarse en la parte externa de las proteínas.

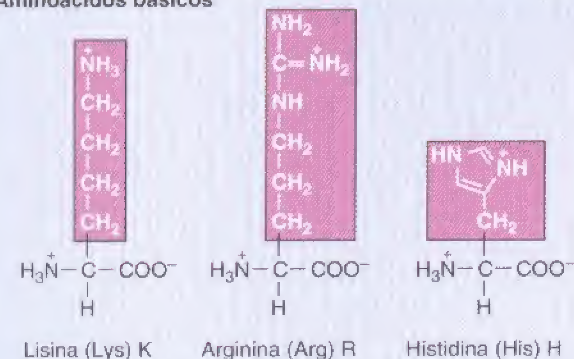
Los aminoácidos lisina, arginina e histidina tienen cadenas laterales con grupos básicos cargados. La lisina y la arginina son aminoácidos muy básicos, y sus cadenas laterales están cargadas positivamente dentro de la célula. Por lo

*Figura 2.13*
**Estructura de los aminoácidos.** Cada aminoácido consiste en un átomo de carbono central (el carbono $\alpha$) ligado a un átomo de hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y una cadena lateral específica (denominada R). A pH fisiológico, tanto el grupo carboxilo como el amino se encuentran ionizados, como se muestra en la Figura.





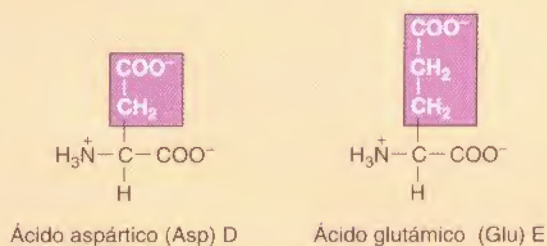




*Figura 2.14*
**Aminoácidos.** Se indican las abreviaturas de tres y una letra para cada aminoácido. Los aminoácidos se agrupan en cuatro amplias categorías dependiendo de las propiedades de sus cadenas laterales: no polares, polares, básicas y ácidas.

tanto, son muy hidrófilos y se encuentran en contacto con el agua en la superficie de las proteínas. La histidina puede estar sin carga o cargada positivamente a pH fisiológico, así que con frecuencia desempeña un papel activo en reacciones enzimáticas que implican el intercambio de iones hidrógeno, como se muestra en el ejemplo de catálisis enzimática tratado en la siguiente sección.

Por último, dos aminoácidos, el ácido aspártico y el ácido glutámico, tienen cadenas laterales ácidas que terminan en grupos carboxilo. Estos aminoácidos están cargados negativamente dentro de la célula y por lo tanto a menudo se denominan aspartato y glutamato. Como los aminoácidos básicos, estos aminoácidos son muy hidrófilos y habitualmente se localizan en la superficie de las proteínas.

Los aminoácidos están unidos por **enlaces peptídicos** entre el grupo $\alpha$ amino de un aminoácido y el grupo $\alpha$ carboxilo del siguiente (Fig. 2.15). Los **polipéptidos** son cadenas lineales de aminoácidos, habitualmente de cientos o



## Experimento clave

# Plegamiento de las cadenas polipeptídicas

**Rotura de reducción de los puentes disulfuro en la ribonucleasa**
Michael Sela, Frederick H.White, Jr., y Christian B. Anfinsen

National Institutes of Health, Bedestha, MD
*Science, Volumen 125, 1957, págs. 691-692*

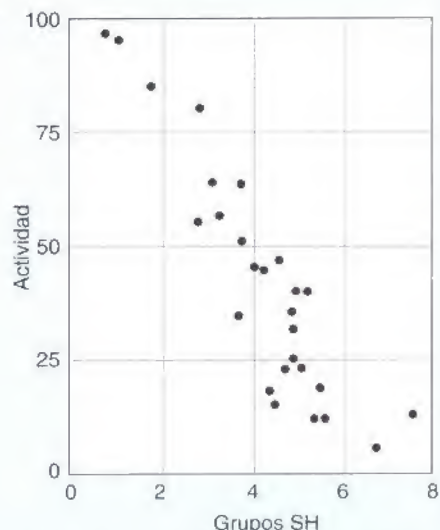
### Contexto

Las proteínas funcionales son estructuralmente mucho más complejas que las cadenas lineales de aminoácidos. La formación de enzimas activas o de otras proteínas requiere del plegamiento de las cadenas polipeptídicas en configuraciones tridimensionales precisas. Esta diferencia entre las proteínas y las cadenas polipeptídicas plantea preguntas cruciales con relación a la comprensión de la estructura y función proteica. ¿Cómo se escoge la configuración proteica adecuada de las múltiples configuraciones posibles que podrían ser adoptadas por un polipéptido, y cuál es la naturaleza de la información que dirige el plegamiento de las proteínas?

Los clásicos experimentos realizados por Christian Anfinsen y sus colaboradores proporcionan respuestas a estas preguntas. Estudiando la enzima ribonucleasa, Anfinsen y sus colaboradores fueron capaces de demostrar que las proteínas desnaturalizadas pueden replegarse espontáneamente adoptando una configuración activa. Por lo tanto, toda la información requerida para especificar la configuración tridimensional correcta de una proteína está contenida en su secuencia primaria de aminoácidos. Una serie de estos experimentos llevó a Anfinsen a la conclusión de que la estructura tridimensional nativa de una proteína se corresponde a su conformación termodinámicamente más estable, determinada por las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes. Las observaciones originales que condujeron a la formulación de este principio crucial fueron comunicadas en este artículo de 1957 por Anfinsen, Michael Sela y Fred White.

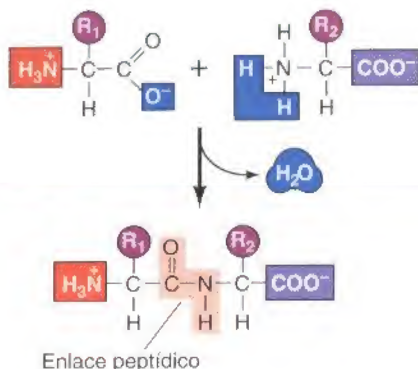
### Experimentos

La proteína estudiada por Sela, White y Anfinsen era la ribonucleasa bovina, una pequeña proteína de 124 aminoácidos que contiene cuatro enlaces disulfuro (S-S) entre las cadenas laterales de residuos de cisteína. La actividad enzimática de la ribonucleasa podía estar determinada por su habilidad para




Resumen de los resultados de los experimentos de renaturalización. La actividad enzimática viene representada como una función del número de grupos sulfhidrilo presentes después de diversos tratamientos. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad de la enzima nativa.

degradar ARN a nucleótidos, proporcionando una evaluación sencilla de la función de la proteína nativa. Esta actividad enzimática se perdía completamente cuando la ribonucleasa se sometía a tratamientos que alteraban los enlaces no covalentes (p. ej., los enlaces de hidrógeno) o desdoblaban los enlaces disulfuro al reducirlos a grupos sulfihidrilo (SH). La proteína desnaturalizada parecía así estar en una conformación aleatoria inactiva.




miles de aminoácidos de longitud. Cada cadena polipeptídica tiene dos extremos distintivos, uno terminando en un grupo α amino (el extremo amino, o N terminal) y el otro en un grupo α carboxilo (el extremo carboxi-, o C, terminal). Los polipéptidos se sintetizan desde el extremo amino al carboxilo terminal, y la secuencia de aminoácidos en un polipéptido se escribe (por convención) en el mismo orden.

La característica definitoria de las proteínas es que son polipéptidos con secuencias de aminoácidos específicas. En 1953, Frederick Sanger fue el pri-

*Figura 2.15*
**Formación de un enlace peptídico.** El grupo carboxilo de un aminoácido se liga al grupo amino de otro.

### *Plegamiento de las cadenas polipeptídicas (continuación)*

Sela, White y Anfinsen observaron, algo crucial, que la actividad enzimática reaparece si la proteína desnaturalizada se incubaba en condiciones que permitía a la cadena polipéptidica replegarse y reformarse a los enlaces disulfuro. En estos experimentos se retiraban los agentes desnaturalizantes, y la enzima inactivada era incubada a temperatura ambiente en un tampón fisiológico en presencia de $O_2$. Este procedimiento llevó a la oxidación de los grupos sulfhidrilo y a la reformación de los enlaces disulfuro. Durante este proceso, la enzima recuperó su actividad catalítica, indicando que se había replegado a su configuración nativa. Debido a que no estaba presente ningún otro componente celular, toda la información requerida para el plegamiento proteico adecuado parecía estar contenida en la secuencia primaria de aminoácidos de la cadena polipeptídica.

### Impacto

Experimentos posteriores definieron las condiciones bajo las que la ribonucleasa desnaturalizada recuperaba completamente su estructura nativa y su actividad enzimática, estableciendo la «hipótesis termodinámica» del plegamiento proteico —esto es, la estructura nativa tridimensional de una proteína corresponde al estado termodinámicamente más estable en condiciones fisiológicas. La estabilidad termodinámica está gobernada por las interacciones de los aminoácidos constitutivos, así que la configuración tridimensional de las proteínas está determinada directamente por su secuencia de aminoácidos. Puesto que el orden de los nucleótidos en el ADN especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, se deduce que la secuencia de nucleótidos de un gen contiene toda la información necesaria para determinar la estructura tridimensional de su producto proteico.

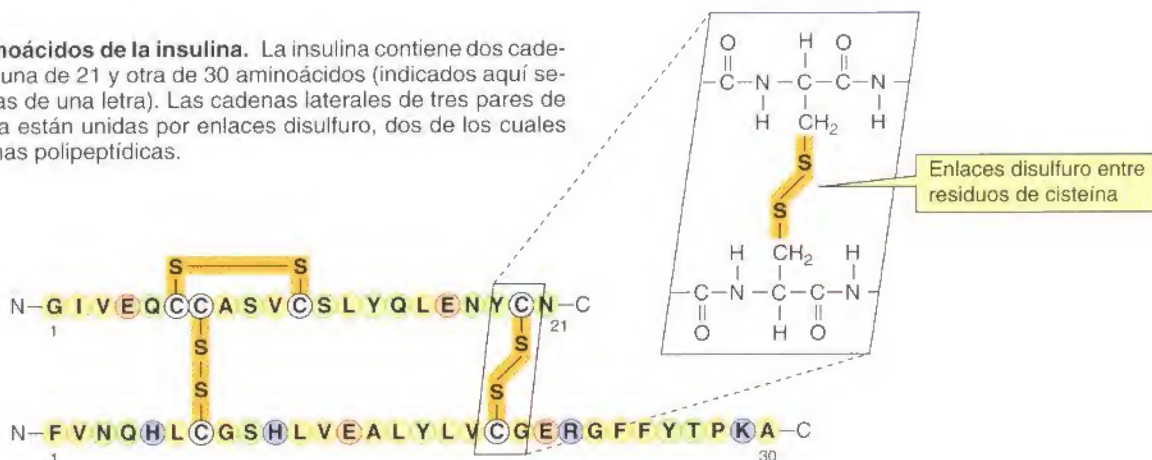
Aunque el trabajo de Anfinsen estableció la base termodinámica del plegamiento proteico, comprender el mecanismo de este proceso continúa siendo un área de investigación activa. El plegamiento proteico es extremadamente complejo, y todavía somos incapaces de deducir la estructura tridimensional de una proteína directamente de su secuencia de aminoácidos. También es importante destacar que el plegamiento espontáneo de las proteínas *in vitro* es mucho más lento que el plegamiento proteico dentro de la célula, que es asistido por enzimas (véase Cap. 7). El plegamiento proteico continúa siendo de este modo un desafío central en la química biológica.



Christian Anfinsen

mero en determinar la secuencia completa de aminoácidos de una proteína, la hormona insulina. Se encontró que la insulina estaba constituida por dos cadenas polipeptídicas, unidas por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína (Fig. 2.16). Lo que era más importante, el experimento de Sanger reveló que cada proteína consiste en una secuencia específica de aminoácidos. Las proteínas

*Figura 2.16*
**Secuencia de aminoácidos de la insulina.** La insulina contiene dos cadenas polipeptídicas, una de 21 y otra de 30 aminoácidos (indicados aquí según sus abreviaturas de una letra). Las cadenas laterales de tres pares de residuos de cisteína están unidas por enlaces disulfuro, dos de los cuales conectan las cadenas polipeptídicas.



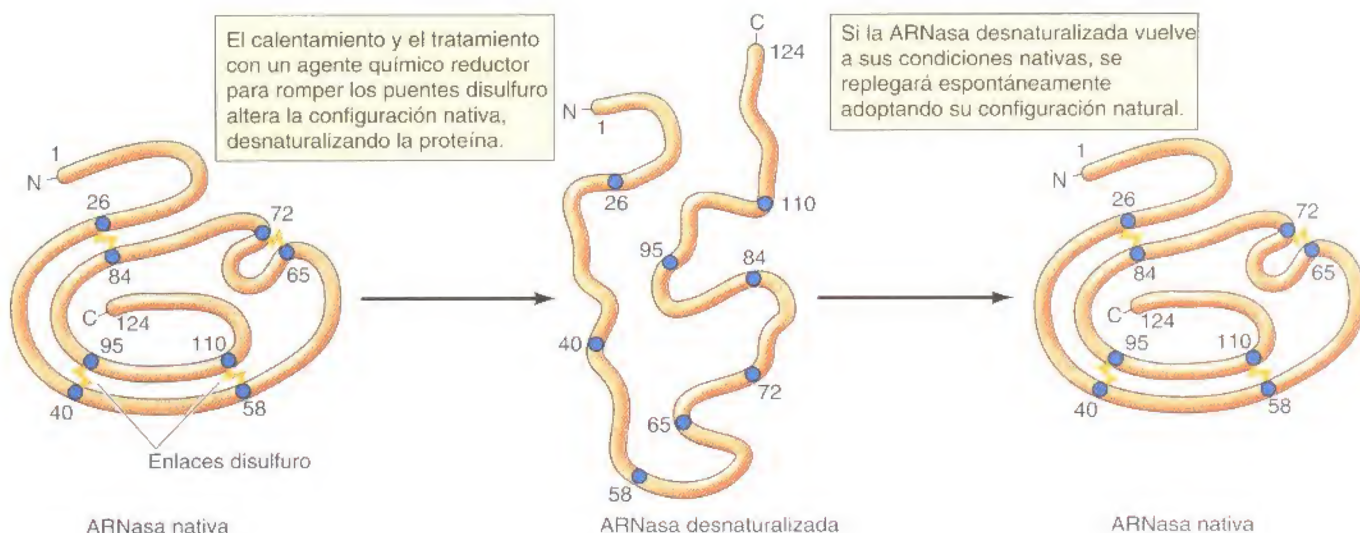



*Figura 2.17*
**Desnaturalización y replegamiento proteico.** La ribonucleasa (ARNasa) es una proteína de 124 aminoácidos (indicados por números). La proteína normalmente está plegada en su configuración natural, que contiene cuatro enlaces disulfuro (indicados como círculos pareados que representan residuos de cisteína).

se secuencian actualmente utilizando métodos automatizados, y hoy por hoy se conoce la secuencia completa de aminoácidos de más de 100.000 proteínas. Cada una consiste en una secuencia única de aminoácidos, determinada por el orden de los nucleótidos en un gen (véase Cap. 3).

La secuencia de aminoácidos de una proteína es sólo el primer elemento de su estructura. En vez de ser cadenas prolongadas de aminoácidos, las proteínas adoptan configuraciones tridimensionales características que son cruciales para su función. Estas configuraciones tridimensionales de las proteínas son el resultado de las interacciones entre sus aminoácidos constituyentes, así que la forma de las proteínas viene determinada por su secuencia de aminoácidos. Esto fue demostrado por primera vez por los experimentos de Christian Anfinsen en los que alteró la estructura tridimensional de las proteínas mediante tratamientos tales como el calentamiento, que rompen los enlaces no covalentes —un proceso denominado desnaturalización (Fig. 2.17)—. Después de la incubación en condiciones más favorables, dichas proteínas desnaturalizadas con frecuencia regresan espontáneamente a sus configuraciones nativas, indicando que estas configuraciones están determinadas directamente por la secuencia de aminoácidos.

La estructura tridimensional de las proteínas se analiza con mayor frecuencia por **cristalografía de rayos X**, una técnica de alta resolución que puede determinar el ordenamiento de átomos individuales dentro de una molécula. Se dirige un haz de rayos X a los cristales de la proteína que se desea analizar, y el patrón de rayos X que pasan a través del cristal proteínico se detecta en una película de rayos X. A medida que los rayos X chocan contra el cristal, son dispersados en patrones característicos determinados por el ordenamiento de los átomos en la molécula. La estructura de la molécula puede por tanto ser deducida a partir del patrón de rayos X dispersados (el patrón de difracción).

En 1958, John Kendrew fue el primero en determinar la estructura tridimensional de una proteína, la mioglobina —una proteína relativamente simple de 153 aminoácidos (Fig. 2.18)—. Desde entonces, se ha analizado la estructura tridimensional de varios miles de proteínas. La mayoría, como la mioglobina, son proteínas globulares con cadenas polipeptídicas plegadas en estructuras

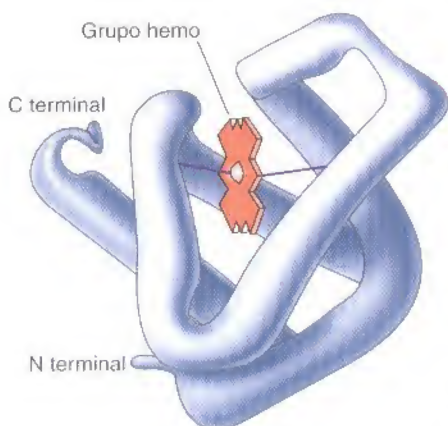



*Figura 2.18*
**Estructura tridimensional de la mioglobina.** La mioglobina es una proteína de 153 aminoácidos que está implicada en el transporte de oxígeno. La cadena polipeptídica está plegada alrededor del grupo hemo que sirve como lugar de enlace de oxígeno.

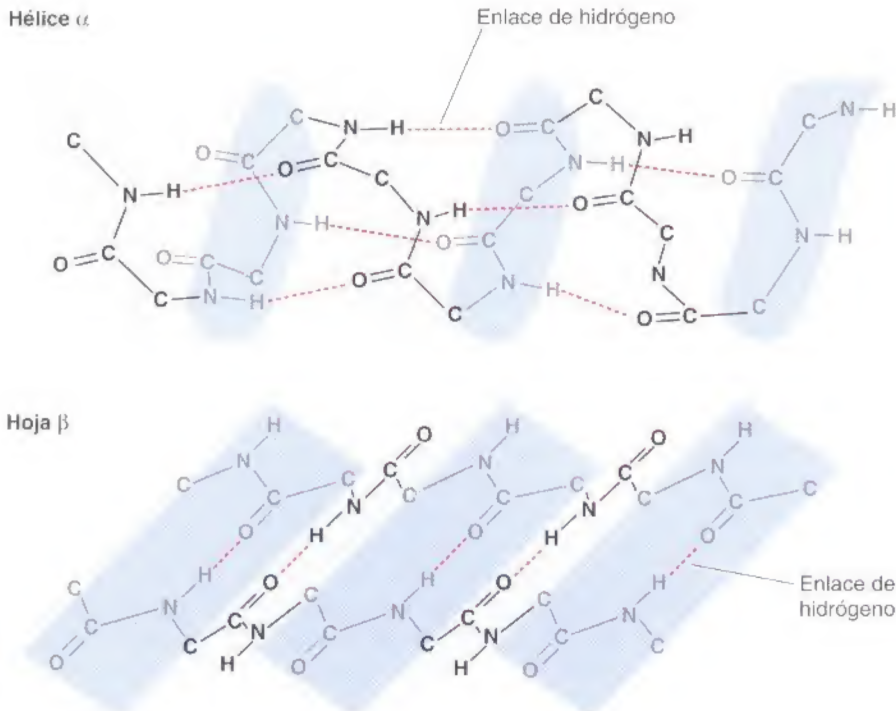


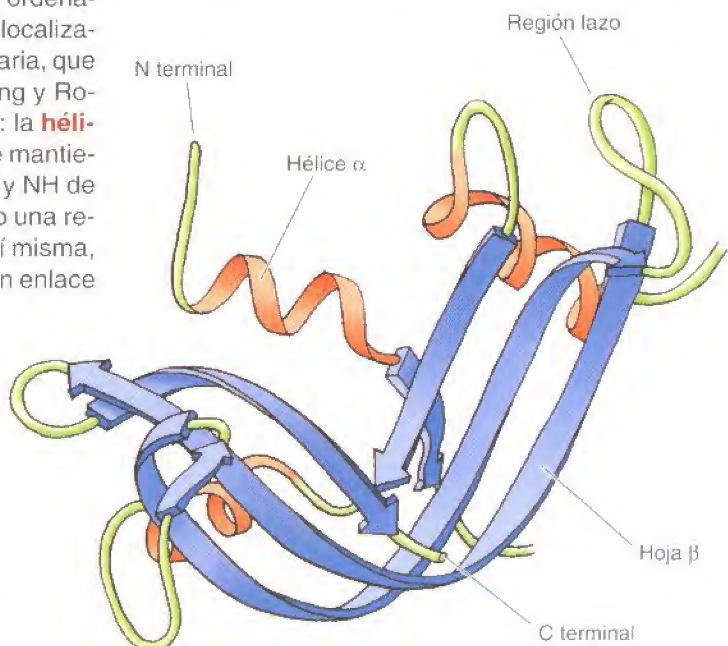

*Figura 2.19*
**Estructura secundaria de las proteínas.** Los tipos más comunes de estructura secundaria son la hélice α y la hoja β. En la hélice α, los enlaces de hidrógeno se forman entre grupos CO y NH de enlaces peptídicos separados por cuatro residuos de aminoácidos. En la hoja β, los enlaces de hidrógeno conectan dos partes de una cadena polipeptídica que se encuentran una junto a otra. Las cadenas laterales de los aminoácidos no se muestran.

compactas, aunque algunas (como las proteínas estructurales de los tejidos conectivos) son largas moléculas fibrosas. El análisis de la estructura tridimensional de estas proteínas ha revelado varios principios básicos que gobiernan el plegamiento proteínico, aunque la estructura proteica es tan compleja que predecir la estructura tridimensional de una proteína directamente a partir de su secuencia de aminoácidos es imposible.

La estructura proteica generalmente se describe en cuatro niveles. La **estructura primaria** de una proteína es la secuencia de aminoácidos de su cadena polipeptídica. La **estructura secundaria** es el ordenamiento regular de aminoácidos dentro de regiones localizadas del polipéptido. Dos tipos de estructura secundaria, que fueron propuestos por primera vez por Linus Pauling y Robert Corey en 1951, son particularmente comunes: la **hélice *α*** y la **hoja *β***. Ambas estructuras secundarias se mantienen por enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH de los enlaces peptídicos. La hélice α se forma cuando una región de una cadena polipeptídica se enrolla sobre sí misma, con el grupo CO de un enlace peptídico formando un enlace de hidrógeno con el grupo NH de un enlace peptídico situado cuatro residuos más abajo de la cadena lineal polipeptidica (Fig. 2.19). En contraste, la hoja β se forma cuando dos partes de una cadena polipeptidica se encuentran una junto a otra con enlaces de hidrógeno entre ellas. Estas hojas β pueden formarse entre varias hebras polipeptídicas, que pueden estar orientadas bien paralela o antiparalelamente entre sí.

La **estructura terciaria** es el plegamiento de la cadena polipeptídica como resultado de las interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en diferentes regio-

*Figura 2.20*
**Estructura terciaria de la ribonucleasa.** Estructura terciaria de la ribonucleasa. Regiones de estructura secundaria de hélices α y hojas β, conectadas por regiones lazo, se pliegan en la configuración nativa de la proteína. En esta representación esquemática de la cadena polipeptídica como un modelo de cinta, las hélices α están representadas como espirales y las hojas β como flechas anchas.



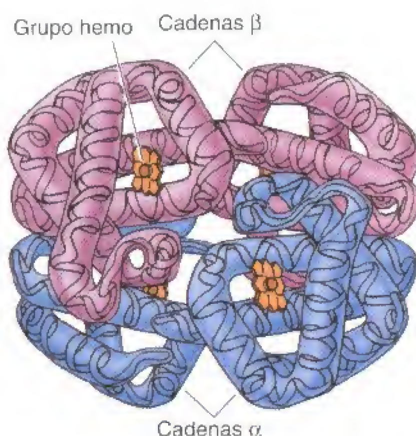



*Figura 2.21*
**Estructura cuaternaria de la hemoglobina.** La hemoglobina se compone de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está ligada a un grupo hemo. Las dos cadenas α y las dos cadenas β son idénticas.

nes de la secuencia primaria (Fig. 2.20). En la mayoría de las proteínas, combinaciones de hélices α y hojas β, conectadas por regiones lazo de la cadena polipeptídica, se pliegan en estructuras globulares compactas denominadas **dominios**, que son las unidades básicas de la estructura terciaria. Las proteínas pequeñas, como la ribonucleasa o la mioglobina, contienen solamente un único dominio; las proteínas más grandes pueden contener varios dominios diferentes, que frecuentemente están relacionados con funciones características.

Un determinante crucial de la estructura terciaria es la localización de los aminoácidos hidrófobos en el interior de la proteína y de los aminoácidos hidrófilos en la superficie, donde interaccionan con el agua. El interior de las proteínas plegadas está constituidos de este modo principalmente de aminoácidos hidrófobos organizados en hélices α y hojas β; estas estructuras secundarias se encuentran en el centro hidrófobo de las proteínas porque los enlaces de hidrógeno neutralizan el carácter polar de los grupos CO y NH de la columna vertebral polipeptídica. Las regiones lazo que conectan los elementos de la estructura secundaria se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas, donde los componentes polares de los enlaces peptídicos forman enlaces de hidrógeno con el agua o con las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófilos. Las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos polares (enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos) en la superficie proteica son también importantes determinantes de la estructura terciaria. Además, los enlaces disulfuro covalentes entre grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína estabilizan la estructura plegada de muchas proteínas de la superficie celular o de secreción.

El cuarto nivel de la estructura proteica, la **estructura cuaternaria**, consiste en las interacciones entre diferentes cadenas polipeptídicas en proteínas compuestas de más de un polipéptido. La hemoglobina, por ejemplo, está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas por el mismo tipo de interacciones que mantienen la estructura terciaria (Fig. 2.21).

De este modo, las características químicas propias de los 20 aminoácidos distintos conducen a una variación considerable en la configuración tridimensional de las proteínas plegadas. En consecuencia, las proteínas constituyen un grupo extremadamente complejo y variado de macromoléculas, adaptadas a la gran variedad de tareas que llevan a cabo en la biología celular.

## Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos

Una tarea fundamental de las proteínas es actuar como enzimas —catalizadores que incrementan la velocidad de prácticamente todas las reacciones químicas dentro de la célula—. Aunque los ARN son capaces de catalizar algunas reacciones, la mayoría de las reacciones biológicas son catalizadas por proteínas. En ausencia de catálisis enzimática, la mayoría de las reacciones bioquímicas son tan lentas que no ocurrirían en condiciones de temperatura y presión compatibles con la vida. Las enzimas aceleran la velocidad de estas reacciones muy por encima de un millón de veces, de tal forma que reacciones que tardarían años en la ausencia de catálisis pueden ocurrir en fracciones de segundo si son catalizadas por la enzima adecuada. Las células contienen miles de enzimas diferentes, y su actividad determina cuáles de las múltiples reacciones químicas posibles tienen lugar en la práctica dentro de la célula.

### *Actividad catalizadora de las enzimas*

Como todos los demás catalizadores, las **enzimas** se caracterizan por dos propiedades fundamentales. En primer lugar, aumentan la velocidad de las reacciones químicas sin ser consumidas o alteradas permanentemente por la reacción. En segundo lugar, aumentan la velocidad de las reacciones sin alterar el equilibrio químico entre sustratos y productos.

Estos principios de catálisis enzimática se ilustran en el siguiente ejemplo, en el que una molécula sobre la que actúa un enzima (denominada **sustrato** [*S*]) se convierte en un **producto** (*P*) como resultado de la reacción. En ausencia de enzima, la reacción puede escribirse como sigue:



$$S \rightleftharpoons P$$

El equilibrio químico entre *S* y *P* depende de las leyes de la termodinámica (como se trata más adelante en la siguiente sección de este Capítulo) y se representa como la razón de las velocidades de las reacciones directa e inversa ($S \rightarrow P$ y $P \rightarrow S$, respectivamente). En presencia de la enzima apropiada, la conversión de S a P se acelera, pero el equilibrio entre *S* y *P* no se altera. Por lo tanto, la enzima debería acelerar las reacciones directa e inversa igualmente. La reacción puede escribirse como sigue:



$$S \overset{E}{\rightleftharpoons} P$$

Obsérvese que la enzima (*E*) no se altera por la reacción, así que el equilibrio químico se mantiene inalterado, determinado tan sólo por las propiedades termodinámicas de *S* y *P*.

El efecto de la enzima en una reacción como esta se ilustra mejor por los cambios energéticos que deben ocurrir durante la conversión de *S* a *P* (Fig. 2.22). El equilibrio de la reacción viene determinado por el estado energético final de S y P, que no están afectados por la catálisis enzimática. Para que la reacción enzimática pueda producirse, sin embargo, el sustrato debe convertirse primero a un estado de mayor energía, denominado **estado de transición**. La energía necesaria para alcanzar el estado de transición (la **energía de activación**) constituye una barrera para el desarrollo de la reacción, limitando la velocidad de la reacción. Las enzimas (y otros catalizadores) actúan reduciendo la energía de activación, incrementando de este modo la velocidad de la reacción. El incremento de velocidad es el mismo tanto en la dirección directa como en la inversa, ya que ambas deben pasar por el mismo estado de transición.

La actividad catalítica de las enzimas implica su unión a los sustratos para formar un complejo enzima-sustrato (*ES*). El sustrato se une a una región específica de la enzima, denominada lugar activo. Mientras está ligado al lugar activo, el sustrato se convierte en el producto de la reacción, que entonces se separa de la enzima. La reacción catalizada por enzimas puede por lo tanto escribirse como sigue:



$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

Obsérvese que E aparece inalterada en ambos lados de la ecuación, así que el equilibrio no se afecta. Sin embargo, la enzima proporciona una superficie sobre la que las reacciones que convierten S en P pueden tener lugar más fácilmente. Esto es el resultado de las interacciones entre la enzima y sustrato que disminuyen la energía de activación y favorecen la formación del estado de transición.

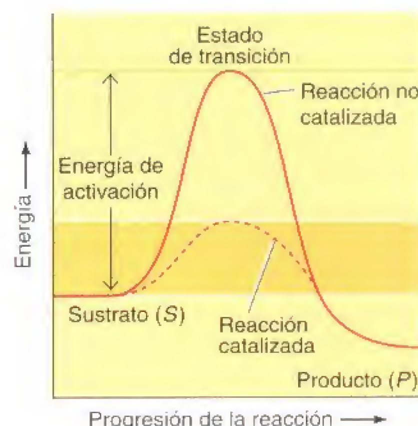
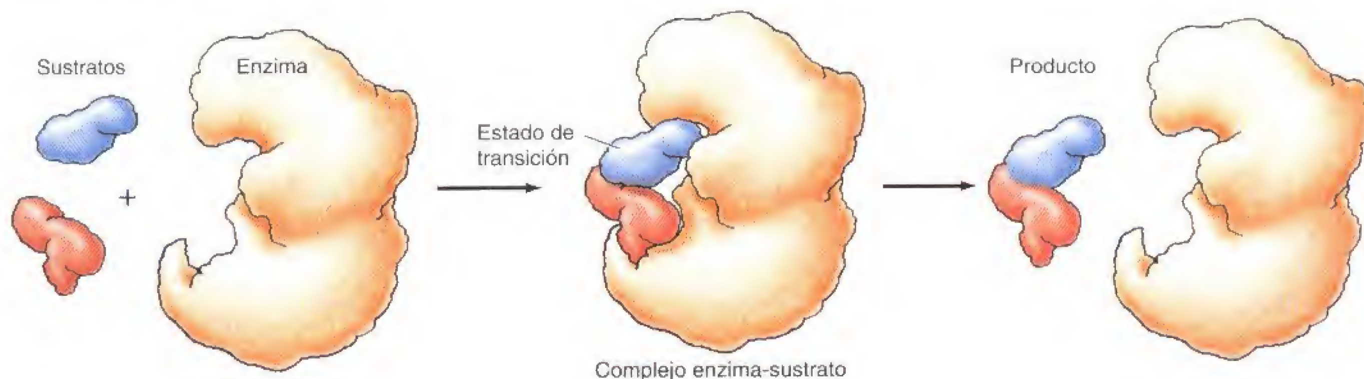



*Figura 2.22*
**Diagramas energéticos para reacciones catalizadas y no catalizadas.** La reacción ilustrada es la conversión simple de un sustrato *S* a un producto *P*. Debido a que el estado final de energía de *P* es menor que el de *S*, la reacción progresa de izquierda a derecha. Para que la reacción tenga lugar, sin embargo, S debe pasar primero por un estado de transición de mayor energía. La energía requerida para alcanzar este estado de transición (la energía de activación) representa una barrera al desarrollo de la reacción y por lo tanto determina la velocidad a la que la reacción avanza. En presencia de un catalizador (p. ej., una enzima), la energía de activación disminuye y la reacción se produce a una velocidad acelerada.

*Figura 2.23*
**Catálisis enzimática de una reacción entre dos sustratos.** La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan en la posición y orientación adecuada para reaccionar entre sí.



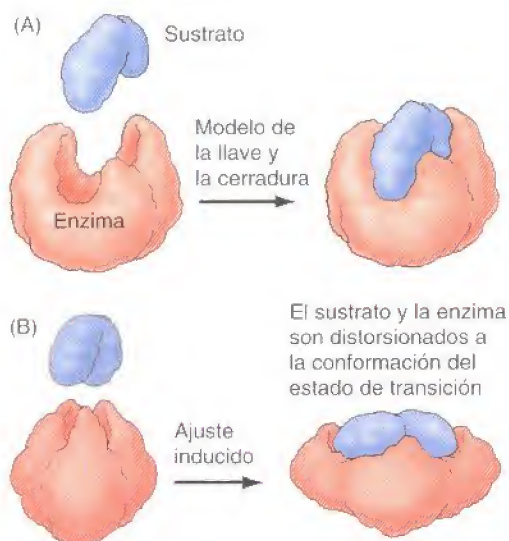



*Figura 2.24*
**Modelos de la interacción enzima-sustrato.** (A) En el modelo de la llave y la cerradura, el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo de la enzima. (B) En el modelo de ajuste inducido, la unión del sustrato distorsiona las conformaciones tanto de la enzima como del sustrato. Esta distorsión aproxima al sustrato a la conformación del estado de transición, acelerando de este modo la reacción.

## *Mecanismos de catálisis enzimática*

La unión del sustrato al sitio activo de una enzima es una interacción muy específica. Los lugares activos son grietas o hendiduras en la superficie de una enzima, habitualmente compuestas de aminoácidos de diferentes partes de la cadena polipeptídica que se aproximan con la estructura terciaria de la proteína plegada. Los sustratos se ligan inicialmente al lugar activo mediante interacciones no covalentes, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrófobas. Una vez que el sustrato está unido al lugar activo de una enzima, múltiples mecanismos pueden acelerar su conversión en el producto de la reacción.

Aunque este sencillo ejemplo tratado en la sección anterior implicaba una única molécula de sustrato, la mayoría de las reacciones bioquímicas implican interacciones entre dos o más sustratos diferentes. Por ejemplo, la formación de un enlace peptídico implica la unión de dos aminoácidos. Para reacciones como esta, la unión de dos o más sustratos al lugar activo en la posición y orientación adecuada acelera la reacción (Fig. 2.23). La enzima proporciona un molde sobre el que los reactantes se aproximan y se orientan correctamente para favorecer la formación del estado de transición en el que interactúan.

Las enzimas también aceleran las reacciones alterando la conformación de sus sustratos para acercarse al del estado de transición. El modelo más sencillo de interacción enzima-sustrato es el **modelo de la llave y la cerradura**, en el que el sustrato encaja perfectamente en el sitio activo (Fig. 2.24). En muchos casos, sin embargo, las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato son modificadas por la unión del sustrato —un proceso denominado **ajuste inducido**—. En estos casos la conformación del sustrato se altera de tal forma que se asemeja más a la del estado de transición. El estrés producido por esta distorsión en el sustrato puede facilitar aún más su conversión hasta alcanzar el estado de transición debilitando enlaces cruciales. Además, el estado de transición se estabiliza por su estrecha unión a la enzima, disminuyendo de este modo la energía de activación requerida.

Aparte de reunir múltiples sustratos y distorsionar la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, muchas enzimas participan directamente en el proceso catalítico. En estos casos, las cadenas laterales específicas de aminoácidos en el sitio activo pueden reaccionar con el sustrato y formar enlaces con intermediarios de la reacción. Los aminoácidos ácidos y básicos están frecuentemente implicados en estos mecanismos catalíticos, como se demuestra en la siguiente discusión sobre la quimotripsina como un ejemplo de catálisis enzimática.

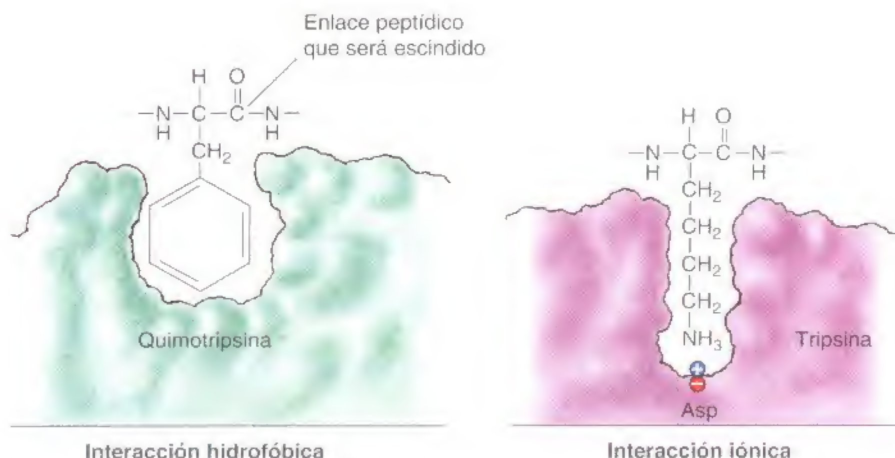
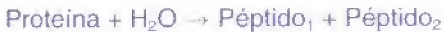



*Figura 2.25*
**Ligamiento del sustrato por las serín proteasas.** El aminoácido adyacente al enlace peptídico que será roto se inserta en un «bolsillo» en el sitio activo de la enzima. En la quimotripsina, el bolsillo liga aminoácidos hidrófobos; el bolsillo de unión de la tripsina contiene un residuo de aspartato cargado negativamente que liga aminoácidos básicos mediante una interacción iónica.

*Figura 2.26*
**Mecanismo catalítico de la quimiotripsina.** Tres aminoácidos en el sitio activo (Ser-195, His-57 y Asp-102) desempeñan papeles cruciales en la catálisis.

La quimiotripsina es miembro de una familia de enzimas (las serín proteasas) que digieren las proteínas catalizando la hidrólisis de los enlaces peptídicos. La reacción puede escribirse como sigue:



Proteína + $H_2O$ → $Péptido_1$ + $Péptido_2$

Los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas (incluyendo quimotripsina, tripsina, elastasa y trombina) tienen especificidades de sustrato características; rompen preferentemente enlaces peptídicos adyacentes a diferentes aminoácidos. Por ejemplo, mientras que la quimotripsina digiere enlaces adyacentes a aminoácidos hidrófobos, como el triptófano y la fenilalanina, la tripsina digiere enlaces junto a aminoácidos básicos, como la lisina y la arginina. Todas las serín proteasas, sin embargo, son similares en estructura y emplean el mismo mecanismo de catálisis. Los sitios activos de estas enzimas contienen tres aminoácidos cruciales —serina, histidina y aspartato— que conducen la hidrólisis del enlace peptídico. En verdad, estas enzimas se denominan serín proteasas debido al papel central del residuo de serina.

Los sustratos se ligan a las serín proteasas mediante la inserción del aminoácido adyacente al sitio de corte en un bolsillo en el lugar activo de la enzima (Fig. 2.25). La naturaleza de este bolsillo determina la especificidad de sustrato de los diferentes miembros de la familia de las serín proteasas. Por ejemplo, el bolsillo de unión de la quimotripsina contiene aminoácidos hidrófobos que interaccionan con las cadenas laterales hidrofóbicas de sus sustratos preferidos. En contraste, el bolsillo de unión de la tripsina contiene un aminoácido cargado negativamente (aspartato), que es capaz de formar un enlace iónico con residuos de arginina o de lisina de sus sustratos.

N terminal
Sitio de corte
C terminal
«Bolsillo» de unión
Ser-195
His-57
Asp-102

La Ser-195 transfiere un $H^+$ a la His-57 y forma un intermediario o estado tetrahédrico de transición con el sustrato. El Asp-102 estabiliza la transferencia del $H^+$ a la His-57 mediante una interacción iónica

Péptido libre

El $H^+$ transferido de la His-57 al sustrato; ruptura del enlace peptídico

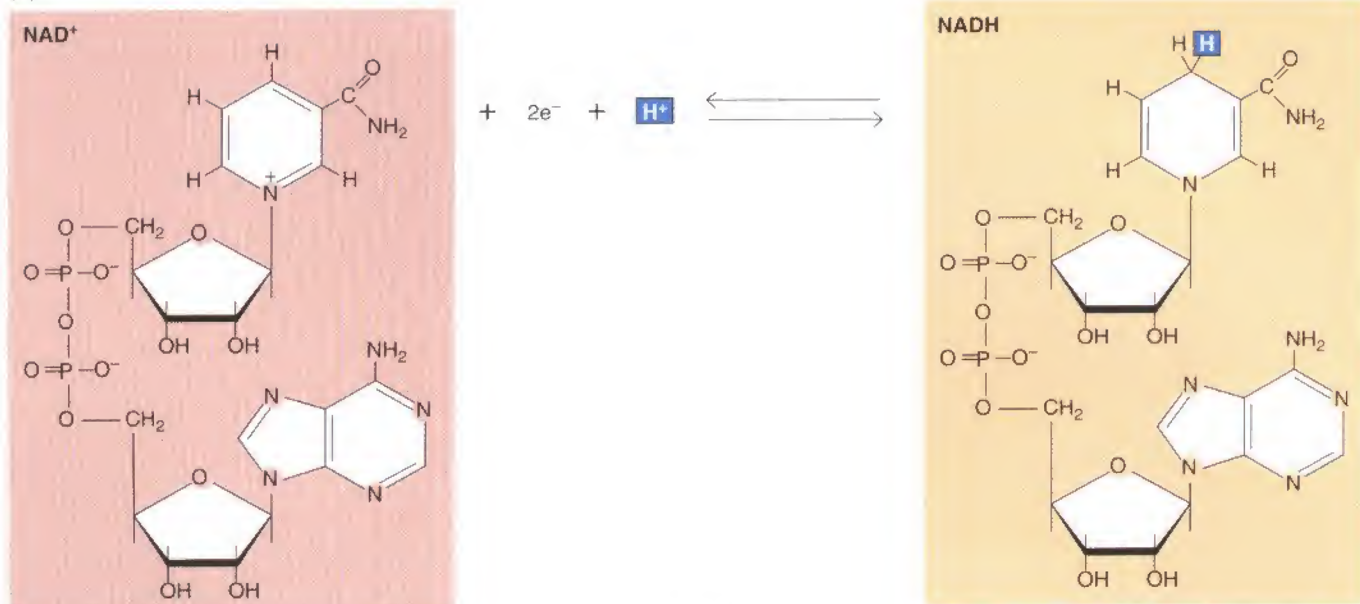
Entra $H_2O$ en el sitio activo formando un enlace de hidrógeno con la His-57

El $H_2O$ transfiere un $H^+$ a la His-57 y $OH^-$ al sustrato, formando un segundo estado de transición tetrahédrico

El $H^+$ transferido de la His-57 de vuelta a la Ser-195; el péptido N terminal se libera de la enzima

La unión del sustrato sitúa al enlace peptídico para ser desdoblado cercano a la serina del lugar activo (Fig. 2.26). El protón de esta serina entonces se transfiere a la histidina del lugar activo. La conformación del lugar activo favorece esta transferencia de protones porque la histidina interacciona con el residuo de aspartato cargado negativamente. La serina reacciona con el sustrato, formando un intermediario o estado de transición tetrahédrico. El enlace peptídico entonces se desdobla, y la porción C-terminal del sustrato se libera de la enzima. Sin embargo, el péptido N-terminal permanece unido a la serina. Esta situación se resuelve cuando una molécula de agua (el segundo sustrato) entra en el sitio activo y revierte las reacciones precedentes. El protón de la molécula de agua se transfiere a la histidina, y su grupo hidroxilo al péptido, formando un segundo estado de transición tetrahédrico. El protón se transfiere entonces de la histidina de vuelta a la serina, y el péptido se libera de la enzima, completando la reacción.

Este ejemplo ilustra diversos aspectos de la catálisis enzimática; la especificidad de las interacciones enzima-sustrato, la colocación de las distintas moléculas de sustrato en el sitio activo, y la implicación de los residuos del sitio activo en la formación y estabilización del estado de transición. Aunque miles de enzi-



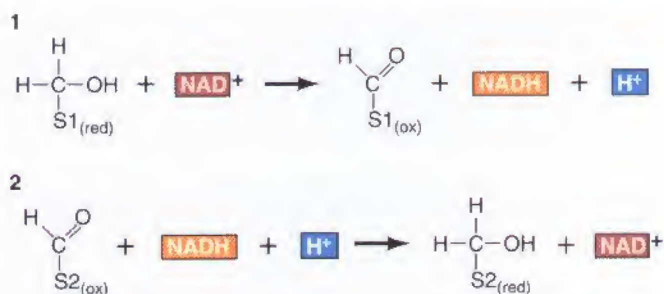







*Figura 2.27*
**Papel del NAD⁺ en las reacciones de óxido-reducción.** (A) El nicotinamín adenín dinucleótido (NAD⁺) actúa como un transportador de electrones en las reacciones de óxido-reducción aceptando electrones (e⁻) para formar NADH. (B) Por ejemplo, el NAD⁺ puede aceptar electrones de un sustrato (S1), produciendo S1 oxidado más NADH. El NADH formado en esta reacción puede entonces transferir sus electrones a un segundo sustrato (S2), produciendo S2 reducido y regenerando NAD⁺. El efecto neto es la transferencia de electrones (transportados por NADH) de S1 (que se oxida) a S2 (que se reduce).

**TABLA 2.1.** Ejemplos de coenzimas y vitaminas

| Coenzima | Vitamina relacionada | Reacción química |
|---|---|---|
| $NAD^+$, $NADP^+$ | Niacina | Óxido-reducción |
| FAD | Riboflavina ($B_2$) | Óxido-reducción |
| Tiamina pirofosfato | Tiamina ($B_1$) | Transferencia de grupos aldehido |
| Coenzima A | Pantoténico | Transferencia de grupos acilo |
| Tetrahidrofolato | Folato | Transferencia de grupos de un carbono |
| Biotina | Biotina | Carboxilación |
| Piridoxal fosfato | Piridoxal ($B_6$) | Transaminación |

mas en las células catalizan muchos diferentes tipos de reacciones químicas, los mismos principios básicos se aplican a su funcionamiento.

## *Coenzimas*

Además de unir a sus sustratos, los lugares activos de muchas enzimas ligan otras pequeñas moléculas que participan en la catálisis. Los **grupos prostéticos** son pequeñas moléculas unidas a proteínas en las que desempeñan papeles cruciales. Por ejemplo, el oxígeno transportado por la mioglobina y la hemoglobina está unido al hemo, un grupo prostético de estas proteínas. En muchos casos iones metálicos (como el cinc o el hierro) están unidos a enzimas y desempeñan papeles centrales en el proceso catalítico. Además, varias moléculas orgánicas de bajo peso molecular participan en tipos específicos de reacciones enzimáticas. Estas moléculas se denominan **coenzimas** porque trabajan junto con las enzimas para aumentar la velocidad de reacción. A diferencia de los sustratos, las coenzimas no se alteran de forma irreversible por las reacciones en las que participan. Más bien, se reciclan y pueden participar en múltiples reacciones enzimáticas.

Las coenzimas sirven como transportadores de distintos tipos de grupos químicos. Un ejemplo importante de una coenzima es el **nicotinamín adenín dinucleótido ($NAD^+$),** que funciona como transportador de electrones en reacciones de óxido-reducción (Fig. 2.27). El $NAD^+$ puede aceptar un ión de hidrógeno ($H^+$) y dos electrones ($e^-$) de un sustrato, formando NADH. El NADH puede entonces donar estos electrones a un segundo sustrato, reformando $NAD^+$. De este modo, el $NAD^+$ transfiere electrones del primer sustrato (que se oxida) al segundo (que se reduce).

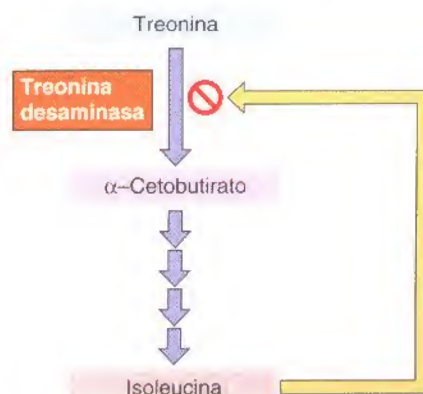
Otras coenzimas diversas también actúan como transportadores de electrones, e incluso otras están implicados en la transferencia de una variedad de grupos químicos adicionales (p. ej., grupos carboxilo y grupos acilo; Tabla 2.1). Las mismas coenzimas funcionan junto a una variedad de diferentes enzimas para catalizar la transferencia de grupos químicos específicos entre una amplia gama de sustratos. Muchas coenzimas están estrechamente relacionados con las vitaminas, que contribuyen a formar parte o toda la estructura de la coenzima. Las vitaminas no son necesarias para bacterias como *E. coli* pero son componentes necesarios de la dieta de los humanos y otros animales superiores, que han perdido la capacidad para sintetizar estos compuestos.

## *Regulación de la actividad enzimática*

Un aspecto importante de la mayoría de las enzimas es que sus actividades no son constantes, pero en cambio pueden ser moduladas. Esto es, las actividades de las enzimas pueden ser reguladas de tal forma que funcionan adecuadamente para cubrir las diversas necesidades fisiológicas que pueden surgir durante el ciclo celular.

Un tipo frecuente de regulación enzimática es la **inhibición por retroalimentación**, en la que el producto de una vía metabólica inhibe la actividad de

*Figura 2.28*
**Inhibición por retroalimentación.** El primer paso en la conversión de treonina a isoleucina es catalizado por la enzima treonina desaminasa. La actividad de esta enzima está inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía.



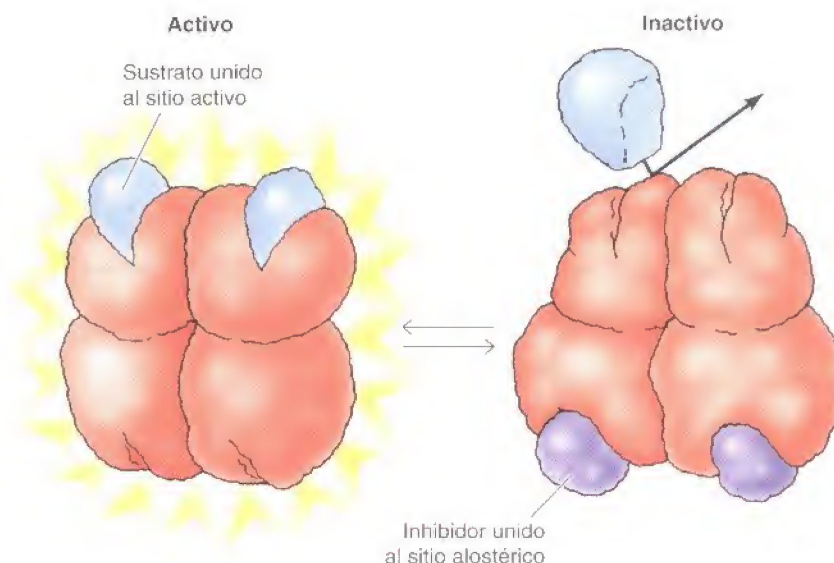



*Figura 2.29*
**Regulación alostérica.** En este ejemplo, la actividad enzimática es inhibida por la unión de una molécula reguladora a un sitio alostérico. En ausencia del inhibidor, el sustrato se une al sitio activo de la enzima y la reacción progresa. La unión del inhibidor al sitio alostérico induce un cambio conformacional en la enzima e impide la unión del sustrato. La mayoría de las enzimas alostéricas constan de múltiples subunidades.

una de las enzimas implicadas en su síntesis. Por ejemplo, el aminoácido isoleucina se sintetiza a través de una serie de reacciones comenzando por el aminoácido treonina (Fig. 2.28). El primer paso de la vía está catalizado por la enzima treonina deaminasa, que es inhibida por la isoleucina, el producto final de la vía. De este modo, una cantidad adecuada de isoleucina en la célula inhibe la treonina desaminasa, bloqueando una síntesis mayor de isoleucina. Si la concentración de isoleucina disminuye, la inhibición por retroalimentación disminuye, la treonina desaminasa ya no se inhibe, y se sintetiza isoleucina adicional. Regulando de este modo la actividad de la treonina desaminasa, la célula sintetiza la cantidad necesaria de isoleucina pero evita desperdiciar energía en la síntesis de más isoleucina de la necesaria.

La inhibición por retroalimentación es un ejemplo de la **regulación alostérica**, en la que la actividad enzimática se controla por la unión de moléculas pequeñas a los lugares reguladores de la enzima (Fig. 2.29). El término «regu-



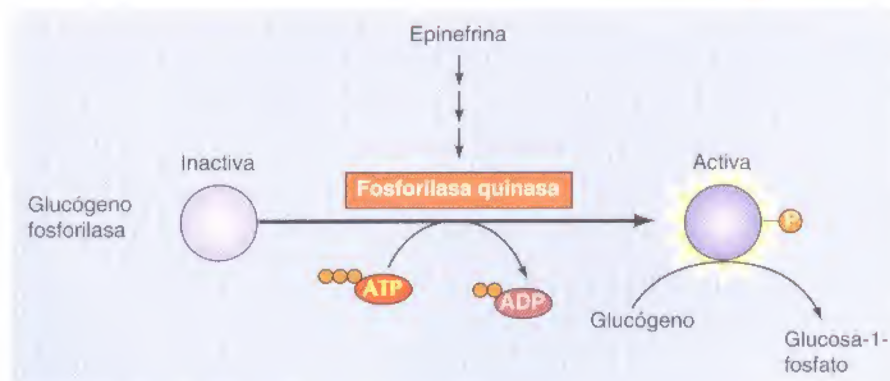




*Figura 2.30*
**Fosforilación de proteínas.** Algunas enzimas están reguladas por la adición de grupos fosfato a los grupos OH de las cadenas laterales de residuos de serina (como se muestra aquí), treonina o tirosina. Por ejemplo, la enzima glucógeno fosforilasa, que cataliza la conversión del glucógeno a glucosa-1-fosfato, es activada por fosforilación en respuesta a la unión de epinefrina a las células musculares.

lación alostérica» deriva del hecho de que las moléculas reguladoras no se unen al sitio catalítico, sino a un sitio específico en la proteína (*allo*=«otro» y *steric*=«sitio»). La unión de la molécula reguladora cambia la conformación de la proteína, lo que a su vez altera la forma del sitio activo y la actividad catalítica de la enzima. En el caso de la treonina desaminasa, el ligamiento de la molécula reguladora (isoleucina) inhibe la actividad enzimática. En otros casos las moléculas reguladoras actúan como activadores, estimulando en vez de inhibir sus enzimas diana.

Las actividades de las enzimas también pueden ser reguladas por sus interacciones con otras proteínas y por modificaciones covalentes, como la adición de grupos fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina. La **fosforilación** es un mecanismo especialmente frecuente para regular la actividad enzimática; la adición de grupos fosfato puede estimular o inhibir las actividades de muchas enzimas diferentes (Fig. 2.30). Por ejemplo, las células musculares responden a la epinefrina (adrenalina) degradando el glucógeno a glucosa, proporcionando de este modo una fuente de energía para una actividad muscular aumentada. La degradación del glucógeno es catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa, que se activa por la fosforilación en respuesta a la unión de la epinefrina a un receptor en la superficie de la célula muscular. La fosforilación de proteínas desempeña un papel central en el control no sólo de las reacciones metabólicas sino también de muchas otras funciones celulares, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

## Energía metabólica

Muchas tareas que debe realizar una célula, como el movimiento y la síntesis de macromoléculas, requieren de energía. Una gran parte de las actividades de la célula están por lo tanto dedicadas a obtener energía del entorno y a emplear esa energía para activar reacciones que la necesitan. Aunque las enzimas controlan la velocidad de prácticamente todas las reacciones químicas dentro de las células, la situación de equilibrio de las reacciones químicas no está afectada por la catálisis enzimática. Las leyes de la termodinámica gobiernan el equilibrio químico y determinan la dirección energéticamente favorable en todas las reacciones químicas. Muchas de las reacciones que deben tener lugar dentro de las células son energéticamente desfavorables, y por lo tanto sólo pueden producirse con un ingreso adicional de energía. En consecuencia, las células deben gastar constantemente energía derivada del entorno. La generación y utilización de energía metabólica es por lo tanto fundamental en toda la biología celular.

### *Energía libre y ATP*

La energética de las reacciones bioquímicas se describe mejor en términos de función termodinámica denominada **energía libre de Gibbs (*G*)**, así llamada por Josiah Willard Gibbs. La variación en la energía libre ($\Delta G$) de una reacción combina los efectos de cambios en la entalpía (el calor que se libera o es absorbido durante una reacción química) y la entropía (el grado de desorden que resulta de una reacción) para predecir si una reacción es o no energéticamente favorable. Todas las reacciones químicas progresan espontáneamente en la dirección energéticamente favorable, acompañadas por un descenso en la energía libre ($\Delta G < 0$). Por ejemplo, considérese una hipotética reacción en la que A se convierte en B:



$$A \rightleftharpoons B$$

Si $\Delta G < 0$, esta reacción progresará en la dirección directa, como se ha escrito. Si $\Delta G > 0$, sin embargo, la reacción progresará en la dirección inversa y B se convertirá en A.

La $\Delta G$ de una reacción viene determinada no sólo por las propiedades intrínsecas de los reactantes y los productos, sino también por sus concentraciones y otras condiciones de la reacción (p. ej., , la temperatura). De este modo, es útil definir la variación de energía libre de una reacción en condiciones estándar. (Las

condiciones estándar se considera que son 1*M* de concentración de todos los reactantes y productos y 1 atm de presión). La variación de energía libre estándar ($\Delta G^0$) de una reacción está directamente relacionada con su situación de equilibrio porque la $\Delta G$ actual es una función de tanto $\Delta G^0$ como de las concentraciones de reactantes y productos. Por ejemplo, considérese la reacción



$$A \rightleftharpoons B$$

La variación de energía libre puede escribirse como sigue:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [B]/[A]$$

donde *R* es la constante de gases y *T* es la temperatura absoluta.

En equilibrio, $\Delta G = 0$ y la reacción no progresa en ninguna dirección. La constante de equilibrio para la reacción ($K$= [B]/[A] en equilibrio) está de este modo directamente relacionada con $\Delta G^\circ$ por la reacción anterior, que puede expresarse como sigue:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln K$$

o

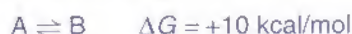
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Si la relación actual [B]/[A] es mayor que la razón de equilibrio ($K$), $\Delta G > 0$ y la acción procede en al sentido inverso (conversión de B en A).

Por otra parte, si la razón [B]/[A] es menor que la razón de equilibrio, $\Delta G < 0$ y A es convertida en B.

La variación de energía libre estándar ($\Delta G^\circ$) de una reacción por lo tanto determina su equilibrio químico y predice en que dirección progresará la reacción en cualquier conjunto dado de condiciones. Para las reacciones bioquímicas, la variación de energía libre estándar se expresa habitualmente como $\Delta G^{\circ\prime}$, que es la variación de energía libre estándar de una reacción en un medio acuoso a pH = 7, aproximadamente las condiciones dentro de una célula.

Muchas reacciones biológicas (como la síntesis de macromoléculas) son termodinámicamente desfavorables ($\Delta G > 0$) en condiciones celulares. Para que estas reacciones puedan progresar, se necesita una fuente adicional de energía. Por ejemplo, considérese la reacción



$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G = +10 \text{ kcal/mol}$$

La conversión de A en B es energéticamente desfavorable, de modo que la reacción progresa en la dirección inversa en vez de en la directa. Sin embargo, la dirección puede conducirse en la dirección directa acoplando la conversión de A en B con una reacción energéticamente favorable, como:



$$C \rightleftharpoons D \qquad \Delta G = -20 \text{ kcal/mol}$$

Si estas dos reacciones se combinan, la reacción combinada puede escribirse como sigue:



$$A + C \rightleftharpoons B + D \qquad \Delta G = -10 \text{ kcal/mol}$$

La $\Delta G$ de la reacción combinada es la suma de las variaciones en la energía libre de sus componentes individuales, así que la reacción combinada es energéticamente favorable y progresará como se describe. De este modo, la conversión energéticamente desfavorable de A en B está facilitada por su combinación con una segunda reacción asociada con una gran disminución en la energía libre. Las enzimas son responsables de llevar a cabo estas reacciones combinadas de una forma coordinada.

La célula utiliza este mecanismo básico para facilitar las muchas reacciones energéticamente desfavorables que deben tener lugar en los sistemas biológicos. El **adenosín 5′-trifosfato (ATP)** desempeña un papel protagonista en este pro-

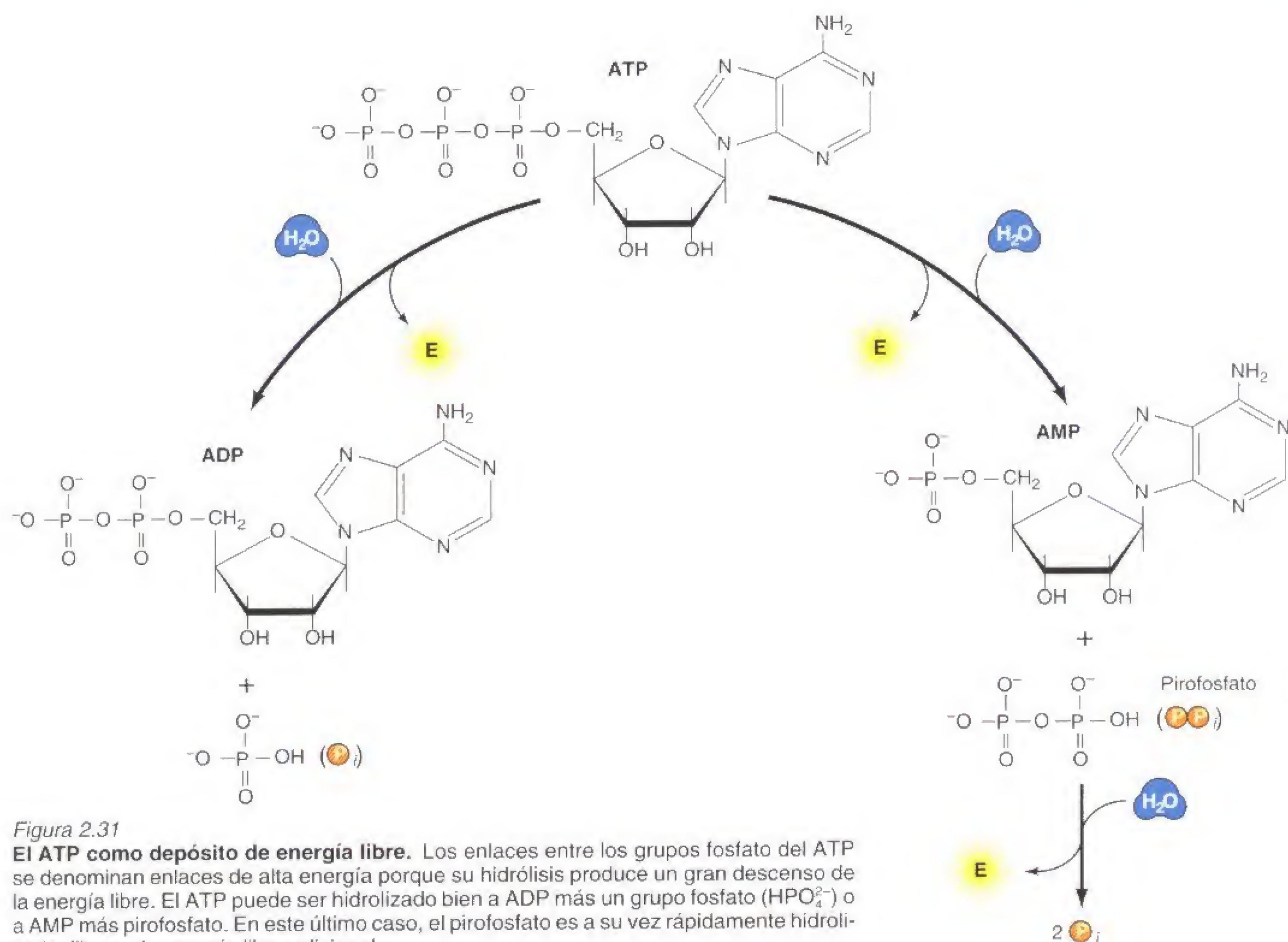



*Figura 2.31*
**El ATP como depósito de energía libre.** Los enlaces entre los grupos fosfato del ATP se denominan enlaces de alta energía porque su hidrólisis produce un gran descenso de la energía libre. El ATP puede ser hidrolizado bien a ADP más un grupo fosfato ($HPO_4^{2-}$) o a AMP más pirofosfato. En este último caso, el pirofosfato es a su vez rápidamente hidrolizado, liberando energía libre adicional.

ceso actuando como un depósito de energía libre dentro de la célula (Fig. 2.31). Los enlaces entre los fosfatos del ATP se conocen como **enlaces de alta energía** porque su hidrólisis se acompaña de un descenso relativamente grande en la energía libre. No hay nada especial en los enlaces químicos en sí mismos; se denominan enlaces de alta energía sólo porque una gran cantidad de energía libre se libera cuando son hidrolizados dentro de la célula. En la hidrólisis del ATP a ADP más fosfato ($P_i$), $\Delta G^{\circ\prime}$ = 7,3 kcal/mol. Recuérdese, sin embargo, que $\Delta G^{\circ\prime}$ se refiere a las «condiciones estándar» en las que las concentraciones de todos los productos y reactantes son de 1 *M*. Las concentraciones reales de $P_i$ son aproximadamente de $10^{-2}$ *M*, y las concentraciones intracelulares de ATP son mayores de las de ADP. Estas diferencias entre las concentraciones intracelulares y las del estado estándar favorecen la hidrólisis de ATP, así que para la hidrólisis de ATP dentro de la célula $\Delta G$ es aproximadamente −12 kcal/mol.

De forma alternativa, el ATP puede ser hidrolizado a AMP más pirofosfato ($PP_i$). Esta reacción produce aproximadamente la misma cantidad de energía libre que la hidrólisis de ATP a ADP. Sin embargo, el pirofosfato producido en esta reacción a su vez rápidamente se hidroliza, con una $\Delta G$ similar a la de la hidrólisis de ATP. De este modo, la variación total de energía libre que resulta de la hidrólisis de ATP a AMP es aproximadamente el doble de la obtenida de la hidrólisis de ATP a ADP. En comparación, el enlace entre el azúcar y el grupo fosfato del AMP, en vez de tener alta energía, es un típico enlace covalente; para la hidrólisis de AMP, $\Delta G^{\circ\prime}$ = −3,3 kcal/mol.

Debido al descenso acompañante en la energía libre, la hidrólisis de ATP puede emplearse para promover otras reacciones que requieren energía dentro de la célula. Por ejemplo, la primera reacción de la glicolisis (tratada en la siguiente sección) es la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato. La reacción puede escribirse como sigue:



$$\text{Glucosa} + \text{Fosfato } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + H_2O$$

Debido a que esta reacción es energéticamente desfavorable tal y como está escrita ($\Delta G^{\circ\prime}$ = +3,3 kcal/mol), debe facilitarse en la dirección directa acoplándose a la hidrólisis de ATP ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –7,3 kcal/mol):



$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

La reacción combinada puede escribirse como sigue:



$$\text{Glucosa} + ATP \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + ADP$$

La variación de energía libre para esta reacción es la suma de las variaciones de energía libre de las reacciones individuales, así que para la reacción combinada $\Delta G^{\circ\prime}$ = –4,0 kcal/mol, favoreciendo la formación de glucosa-6-fosfato.

Otras moléculas, incluyendo otros nucleótidos trifosfatos (p. ej., GTP), también tienen enlaces de alta energía y pueden utilizarse como el ATP para promover reacciones que requieren energía. Para la mayoría de las reacciones, sin embargo, el ATP proporciona la energía libre. Las reacciones que producen energía dentro de la célula están por lo tanto acopladas a la síntesis de ATP, mientras que las reacciones que requieren energía están acopladas a la hidrólisis de ATP. Los enlaces de alta energía del ATP desempeñan de este modo un papel crucial en el metabolismo celular al servir como forma de depósito de energía libre utilizable.

## *Generación de ATP a partir de glucosa*

La degradación de carbohidratos, particularmente glucosa, es la fuente principal de energía celular. La degradación oxidativa completa de glucosa a $CO_2$ y $H_2O$ puede escribirse como sigue:



$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

La reacción produce una gran cantidad de energía libre: $\Delta G^{\circ\prime}$ = –686 kcal/mol. Para convertir esta energía en una forma utilizable, la glucosa se oxida dentro de las células en una serie de pasos acoplados a la síntesis de ATP.

La **glicolisis**, la etapa inicial en la degradación de glucosa, es similar prácticamente en todas las células. La glicolisis ocurre en ausencia de oxígeno y puede proporcionar toda la energía metabólica de organismos anaerobios. En las células aerobias, sin embargo, la glicolisis es sólo la primera etapa en la degradación de glucosa.

Las reacciones de la glicolisis dan lugar a la degradación de glucosa a piruvato, con una ganancia neta de dos moléculas de ATP (Fig. 2.32). Las reacciones iniciales de la vía de hecho consumen energía, usando el ATP para fosforilar la glucosa a glucosa-6-fosfato y luego la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. Las enzimas que catalizan estas dos reacciones —hexoquinasa y fosfofructoquinasa respectivamente— son importantes puntos reguladores de la vía glucolítica. El principal elemento de control es la fosfofructoquinasa, que es inhibida por niveles altos de ATP. La inhibición de la fosfofructoquinasa da lugar al acumulo de la glucosa-6-fosfato, que a su vez inhibe a la hexoquinasa. De este modo, cuando la célula tiene un suministro adecuado de energía metabólica disponible en forma de ATP, se inhibe la degradación de glucosa.

Las reacciones que siguen a la formación de fructosa-1,6-difosfato constituyen la parte productora de energía de la vía glucolítica. La degradación de fructosa-1,6-difosfato produce dos moléculas del azúcar de tres carbonos gliceral-

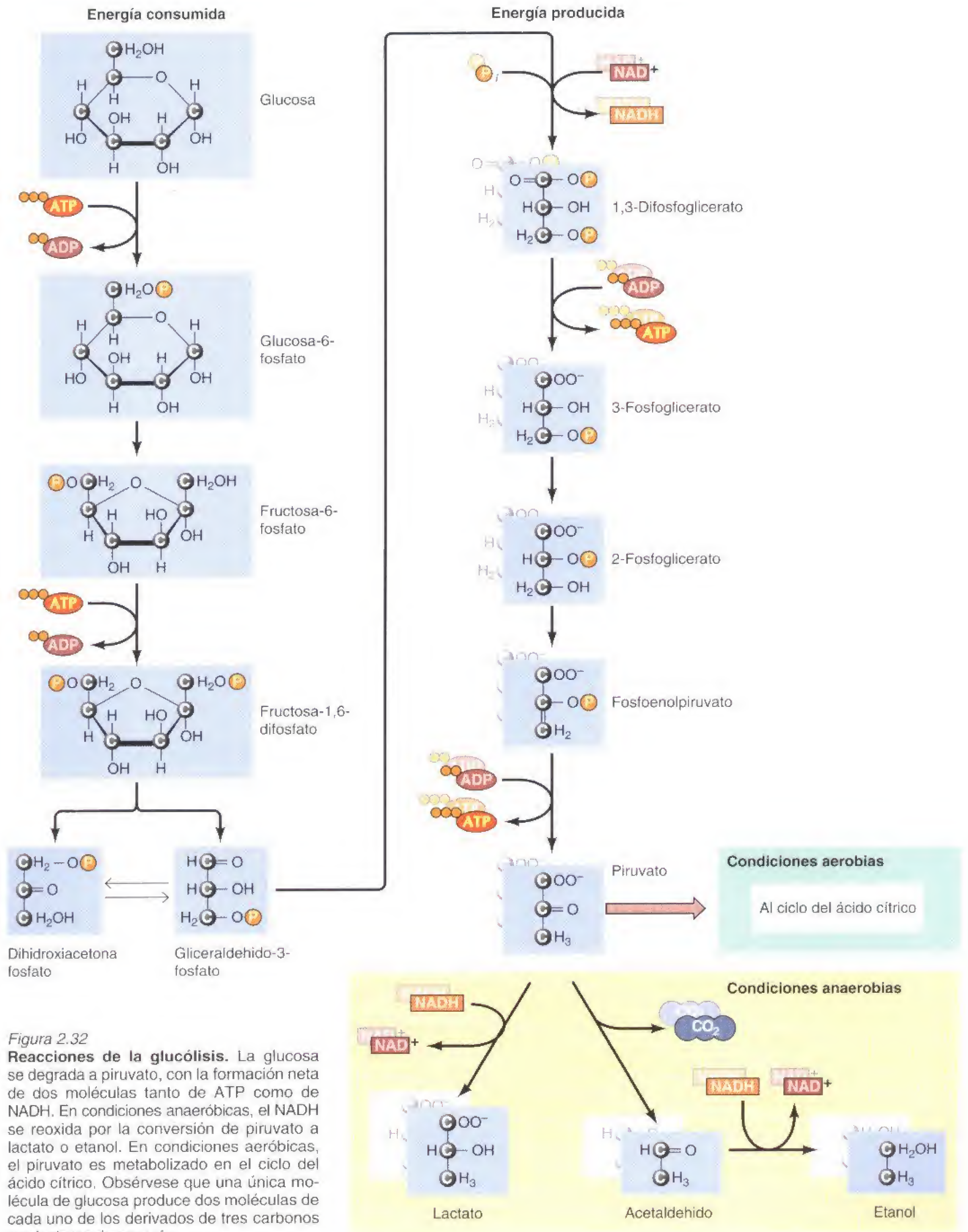
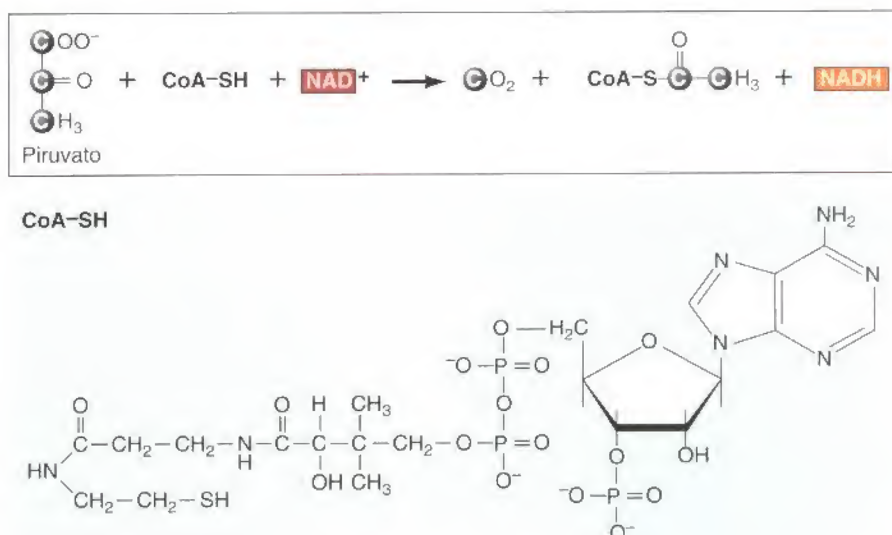



*Figura 2.32*
**Reacciones de la glucólisis.** La glucosa se degrada a piruvato, con la formación neta de dos moléculas tanto de ATP como de NADH. En condiciones anaeróbicas, el NADH se reoxida por la conversión de piruvato a lactato o etanol. En condiciones aeróbicas, el piruvato es metabolizado en el ciclo del ácido cítrico. Obsérvese que una única molécula de glucosa produce dos moléculas de cada uno de los derivados de tres carbonos productores de energía.

*Figura 2.33*
**Descarboxilación oxidativa del piruvato.** El piruvato se convierte en $CO_2$ y acetil-CoA, y se produce en este proceso una molécula de NADH. La coenzima A (CoA-SH) es un transportador general de grupos acetilo activados en diversas reacciones.




dehido-3-fosfato, que se oxida a 1,3-difosfoglicerato. El grupo fosfato de este compuesto tiene una energía libre de hidrólisis muy alta ($\Delta G^{\circ\prime} = 11,5$ kcal/mol), así que se utiliza en la siguiente reacción de la glicolisis para promover la síntesis de ATP a partir de ADP. El producto de esta reacción, 3-fosfoglicerato, se convierte entonces en fosfoenolpiruvato, el segundo intermediario de alta energía de la glicolisis. En la hidrólisis del fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato, $\Delta G^{\circ\prime} = -14,6$ kcal/mol, su conversión a piruvato está acoplada a la síntesis de ATP. Cada molécula de gliceraldehido-3-fosfato convertida a piruvato se acopla de este modo a la generación de dos moléculas de ATP; en total, se sintetizan cuatro moléculas de ATP a partir de cada molécula inicial de glucosa. Puesto que se requieren dos ATPs para promover las reacciones iniciales, la ganancia neta de la glicolisis es de dos moléculas de ATP.

Además de producir ATP, la glicolisis convierte dos moléculas de coenzima $NAD^+$ a NADH. En esta reacción, el $NAD^+$ actúa como un agente oxidante que acepta electrones del gliceraldehido-3-fosfato. El NADH formado como producto debe ser reciclado sirviendo como donante de electrones para otras reacciones redox dentro de la célula. En condiciones anaeróbicas, el NADH formado durante la glucolísis se reoxida a $NAD^+$ por la conversión de piruvato a lactato o etanol. En organismos aerobios, sin embargo, el NADH sirve como una fuente adicional de energía al donar sus electrones a la cadena de transporte de electrones, donde finalmente se utilizan para reducir $O_2$ a $H_2O$, acoplado a la generación de ATP adicional.

En células eucarióticas, la glicolisis tiene lugar en el citoplasma. El piruvato entonces se transporta a la mitocondria, donde su oxidación completa a $CO_2$ y $H_2O$ proporciona la mayoría del ATP derivado de la degradación de glucosa. El siguiente paso en el metabolismo del piruvato es su descarboxilación oxidativa en presencia de la **coenzima A (CoA),** que funciona como transportador de grupos acetilo en diversas reacciones metabólicas (Fig. 2.33). Un carbono del piruvato se libera como $CO_2$, y los dos carbonos restantes se unen a la CoA para formar acetil-CoA. En este proceso, una molécula de $NAD^+$ se reduce a NADH.

El acetil-CoA formado en esta reacción entra en el **ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs** (Fig. 2.34), que es la vía central en el metabolismo oxidativo. El grupo acetilo de dos carbonos se combina con oxalacetato (cuatro carbonos) para producir citrato (seis carbonos). A través de otras ocho reacciones, dos carbonos del citrato se oxidan completamente a $CO_2$ y se regenera el oxalacetato. Durante el ciclo, se forma un enlace de alta energía en forma de GTP, que se emplea directamente para promover la síntesis de una molécula de ATP. Además, cada vuelta del ciclo produce tres moléculas de NADH y una molécula

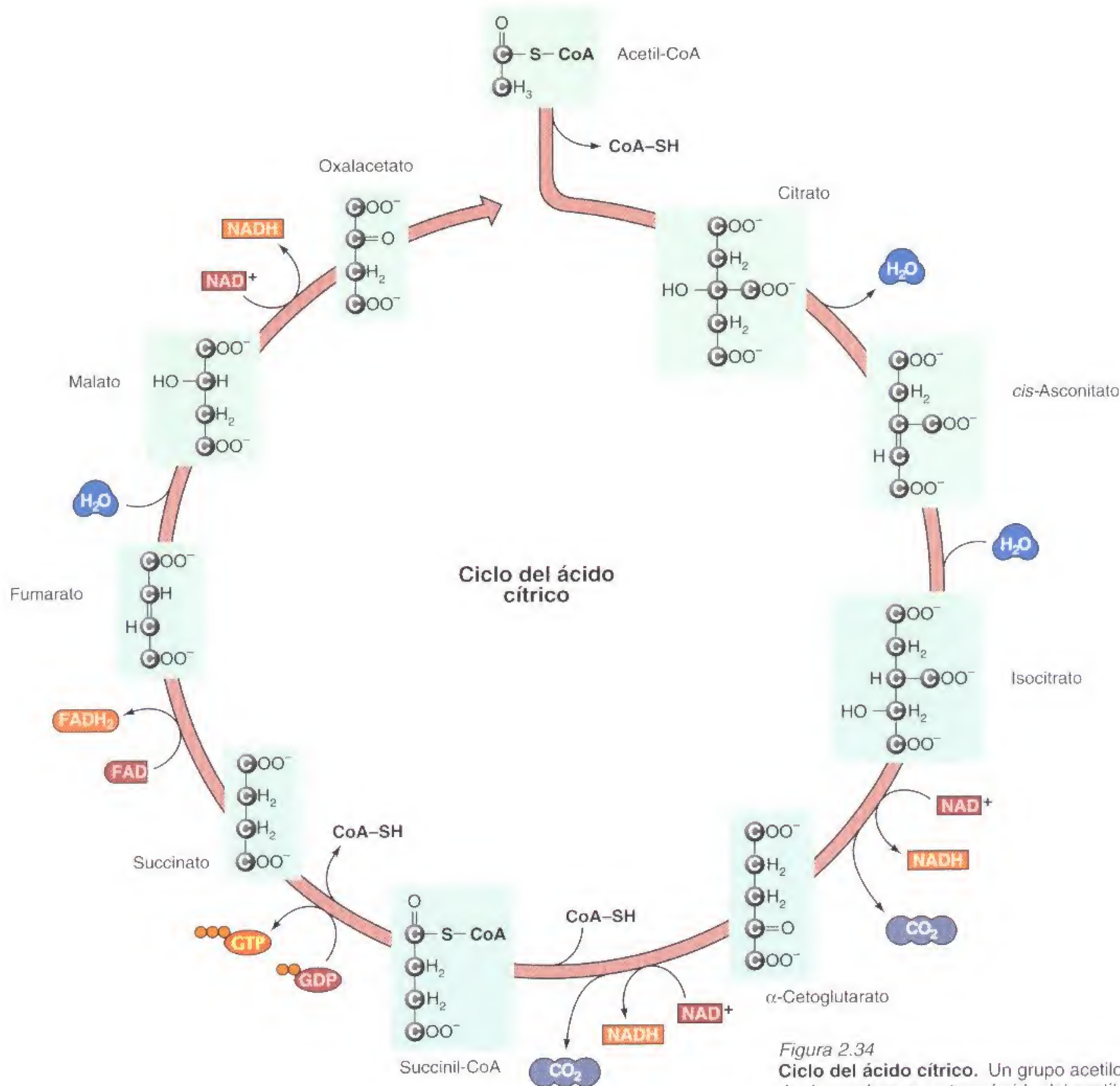



*Figura 2.34*
**Ciclo del ácido cítrico.** Un grupo acetilo de dos carbonos es transferido del acetil-CoA al oxalacetato, formando citrato. Dos carbonos del citrato son entonces oxidados a $CO_2$ y se regenera el oxalacetato. Cada vuelta del ciclo produce una molécula de GTP, tres de NADH y una de $FADH_2$.

de **flavin adenín dinucleótido** reducida **($FADH_2$)**, que es otro transportador de electrones en reacciones redox.

El ciclo del ácido cítrico completa la oxidación de glucosa a seis moléculas de $CO_2$. Se obtienen cuatro moléculas de ATP directamente de cada molécula de glucosa —dos de la glicolisis y dos del ciclo del ácido cítrico (una por cada molécula de piruvato). Además, diez moléculas de NADH (dos de la glicolisis, dos de la conversión de piruvato a acetil-CoA, y seis del ciclo del ácido cítrico) y se forman dos moléculas de $FADH_2$. El resto de la energía derivada de la degradación de la glucosa proviene de la reoxidación del NADH y $FADH_2$, con sus electrones siendo transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones a (finalmente) reducir el $O_2$ a $H_2O$.

Durante la **fosforilación oxidativa**, los electrones del NADH y $FADH_2$ se

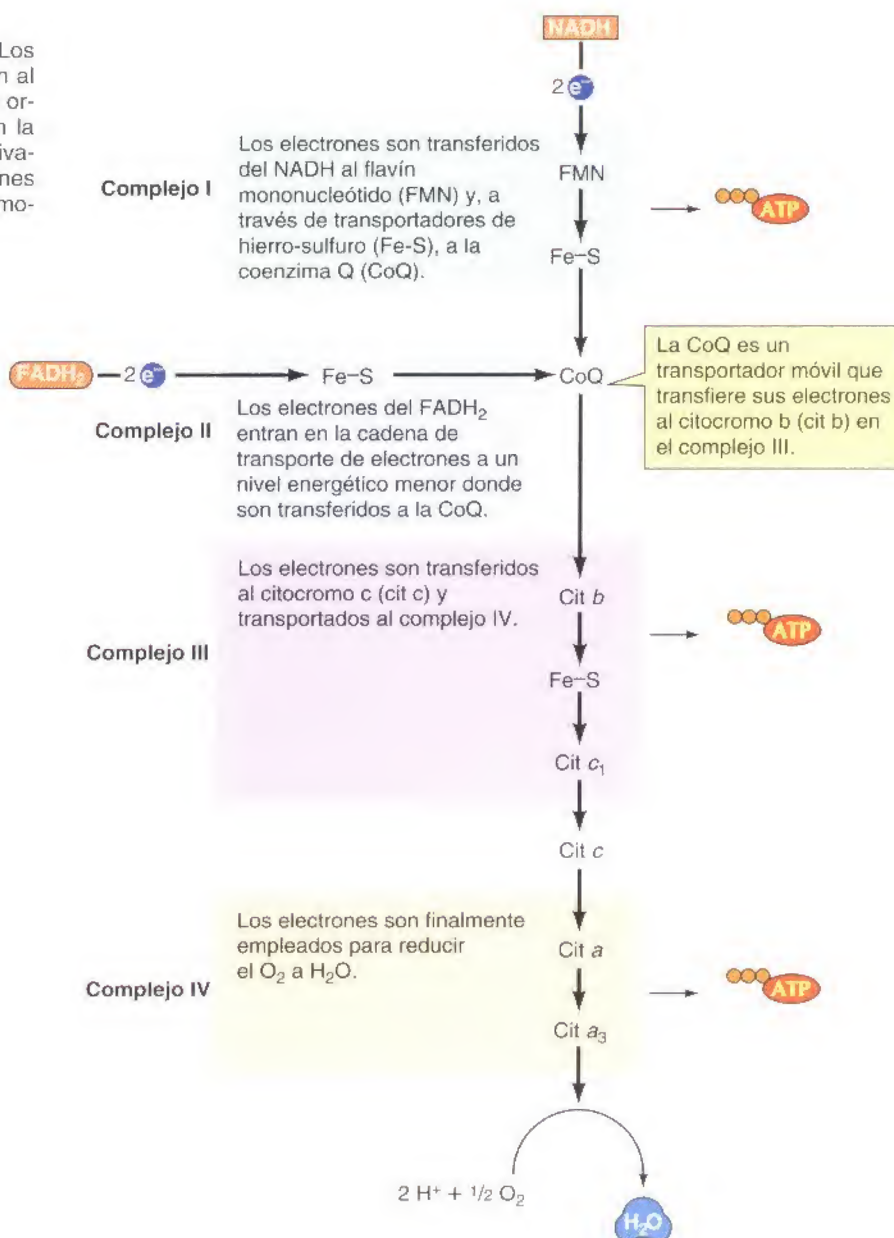



*Figura 2.35*
**Cadena de transporte de electrones.** Los electrones del NADH y $FADH_2$ se transfieren al $O_2$ a través de una serie de transportadores organizados en cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial. La energía libre derivada de las reacciones de transporte de electrones en los complejos I, III y IV se emplea para promover la síntesis de ATP.

combinan con $O_2$, y la energía liberada en el proceso promueve la síntesis de ATP a partir de ADP. La transferencia de electrones de NADH a $O_2$ libera una gran cantidad de energía libre: $\Delta G'$ = −52,5 kcal/mol por cada par de electrones transferido. De modo que esta energía pueda convertirse en una forma utilizable, el proceso tiene lugar gradualmente a través del paso de electrones por una serie de transportadores, que constituyen la **cadena de transporte de electrones** (Fig. 2.35). Los componentes de la cadena de transporte de electrones están localizados en la parte interna de la membrana mitocondrial de las células eucarióticas, y la fosforilación oxidativa se considerará con mayor detalle cuando se expliquen las mitocondrias en el Capítulo 10. En las bacterias aeróbicas, que utilizan un sistema comparable, los componentes de la cadena de transporte de electrones están localizados en la membrana plasmática. En ambos casos, la transferencia de electrones del NADH al $O_2$ produce suficiente energía para promover la síntesis de aproximadamente tres moléculas de ATP. Los electrones del $FADH_2$ entran en la cadena de transporte de electrones a un

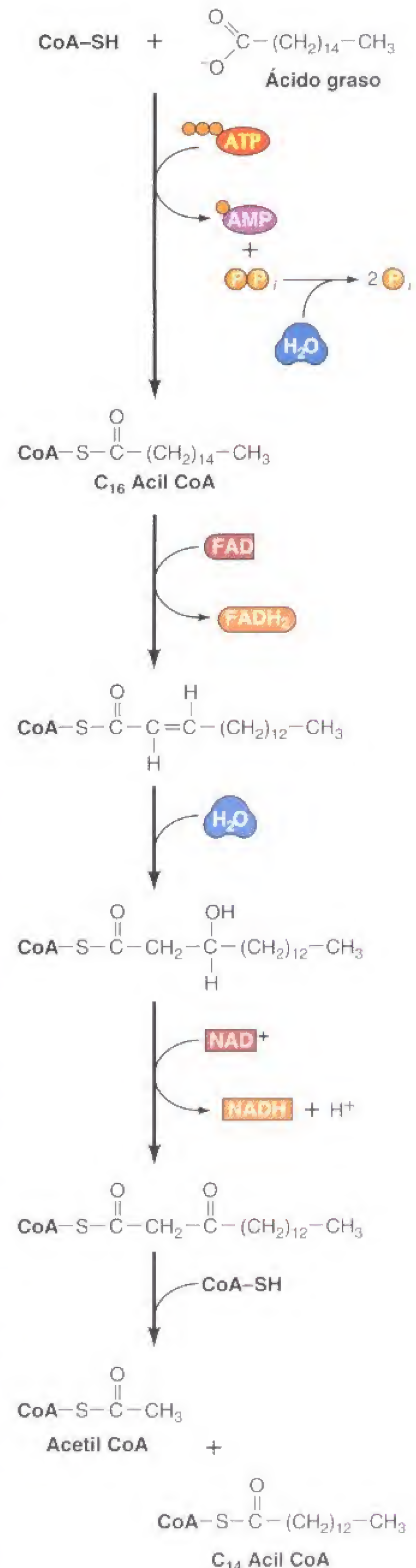



*Figura 2.36*

**Oxidación de los ácidos grasos.** El ácido graso (p. ej., el ácido graso saturado de 16 carbonos palmitato) inicialmente se une a la coenzima A a expensas de una molécula de ATP. La oxidación del ácido graso progresa entonces con la retirada paso a paso de dos unidades de carbono como acetil-CoA, acoplada a la formación de una molécula de NADH y otra de $FADH_2$.

nivel más bajo, así que su transferencia al $O_2$ produce menos energía libre utilizable, sólo dos moléculas de ATP.

Ahora es posible calcular la producción total de ATP de la oxidación de la glucosa. La ganancia neta de la glicolisis es de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. La conversión de piruvato a acetil-CoA y su metabolismo por la vía del ciclo del ácido cítrico produce dos moléculas adicionales de ATP, ocho de NADH y dos de $FADH_2$. Aceptando que se derivan tres moléculas de ATP de la oxidación de cada NADH y dos de cada $FADH_2$, la producción total es de 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Sin embargo, esta producción es menor en algunas células porque las dos moléculas de NADH generadas en la glicolisis en el citoplasma son incapaces de penetrar directamente en la mitocondria. En su lugar, sus electrones deben ser transferidos a la mitocondria por un sistema lanzadera. Dependiendo del sistema empleado, esta transferencia puede dar lugar a la entrada de estos electrones en la cadena de transporte de electrones al nivel del $FADH_2$. En estos casos, las dos moléculas de NADH derivadas de la glicolisis dan lugar a dos en vez de tres moléculas de ATP, reduciendo la producción total a 36 en vez de 38 ATP por molécula de glucosa.

## Producción de energía a partir de otras moléculas orgánicas

La energía en forma de ATP puede obtenerse de la degradación de otras moléculas orgánicas, teniendo las vías implicadas en la degradación de la glucosa de nuevo un papel central. Los nucleótidos, por ejemplo, pueden ser degradados a azúcares, que entonces entran en la vía glucolítica, y los aminoácidos son degradados por la vía del ciclo del ácido cítrico. Las dos formas principales de almacenamiento de energía dentro de las células, los polisacáridos y los lípidos, también pueden ser degradados para producir ATP. Los polisacáridos pueden ser degradados a azúcares libres, que son entonces metabolizados como se vio en la sección anterior. Los lípidos, sin embargo, son moléculas todavía más eficaces en el almacenamiento de energía. Debido a que los lípidos están más reducidos que los carbohidratos, consistiendo básicamente en cadenas hidrocarbonadas, su oxidación produce substancialmente más energía por peso de material inicial.

Las grasas (triacilgliceroles) son la principal forma de almacenamiento de lípidos. El primer paso en su utilización es su degradación a glicerol y ácidos grasos libres. Cada ácido graso se une a una coenzima A, produciendo un acil-CoA graso a expensas de una molécula de ATP (Fig. 2.36). Entonces, los ácidos grasos se degradan paso a paso en un proceso oxidativo, dos carbonos cada vez, produciendo acetil-CoA más un acil-CoA graso con dos carbonos menos. Cada ronda de oxidación también produce una molécula de NADH y otra de $FADH_2$. El acetil-CoA entra entonces en el ciclo del ácido cítrico, y la degradación del resto del ácido graso continúa del mismo modo.

La degradación de un ácido graso de 16 carbonos produce de este modo siete moléculas de NADH, siete de $FADH_2$, y ocho de acetil-CoA. En términos de generación de ATP, esta producción corresponde a 21 moléculas de ATP derivadas de NADH ($3 \times 7$), 14 ATP de $FADH_2$ ($2 \times 7$) y 96 de acetil-CoA ($8 \times 12$). Como se utilizó un ATP para poner en marcha el proceso, la ganancia neta es de 130 ATP por molécula de ácido graso de 16 carbonos. Compárese esta producción con la ganancia neta de 38 ATP por molécula de glucosa. Puesto que el peso molecular de un ácido graso saturado de 16 carbonos es de 256 y el de la glucosa es de 180, la producción de ATP es aproximadamente 2,5 veces mayor por gramo de ácido graso —de ahí la ventaja de los lípidos sobre

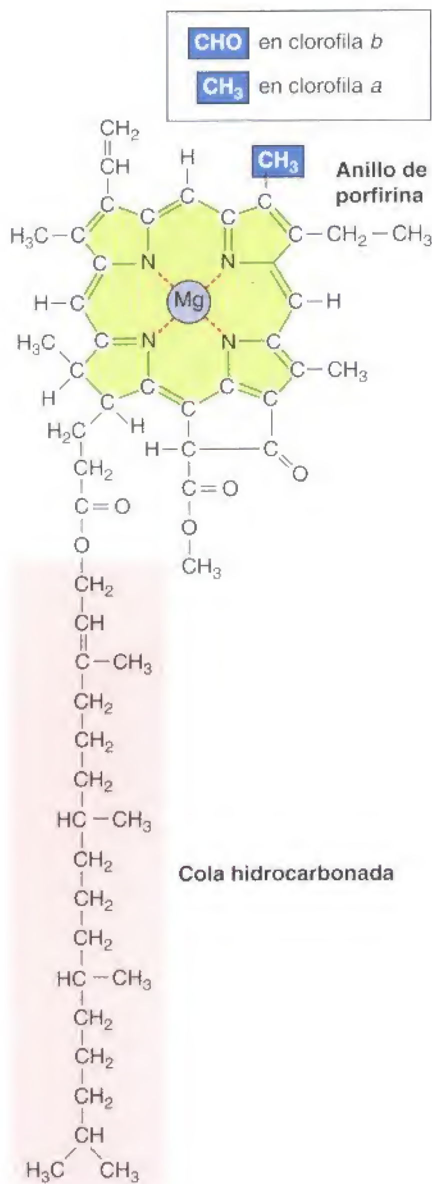



*Figura 2.37*
**Estructura de la clorofila.** Las clorofilas consisten en estructuras de anillos porfirínicos ligadas a colas hidrocarbonadas. Las clorofilas *a* y *b* difieren en un único grupo funcional en el anillo de porfirina.

los polisacáridos como moléculas de almacenamiento de energía.

## *Fotosíntesis*

La generación de energía a partir de la oxidación de carbohidratos y lípidos depende de la degradación de compuestos orgánicos preformados. La energía necesaria para la síntesis de estos compuestos se deriva en último término de la luz solar, que se recoge y emplea por las plantas y las bacterias fotosintetizantes para promover la síntesis de carbohidratos. Al convertir la energía de la luz solar en una forma utilizable de energía química, la fotosíntesis es la fuente de prácticamente toda la energía metabólica en los sistemas biológicos.

La ecuación global de la fotosíntesis puede escribirse como sigue:




$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

El proceso es mucho más complejo, sin embargo, y tiene lugar en dos etapas distintas. En la primera, llamada las **reacciones luminosas**, la energía absorbida de la luz solar promueve la síntesis de ATP y NADPH (una coenzima similar al NADH), acoplada a la oxidación de $H_2O$ a $O_2$. El ATP y el NADPH generados en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir de $CO_2$ y $H_2O$ en un segundo conjunto de reacciones, llamadas las **reacciones oscuras** porque no requieren luz solar. En células eucariotas, tanto las reacciones luminosas como las oscuras tienen lugar en los cloroplastos.

Los **pigmentos fotosintéticos** capturan energía de la luz solar absorbiendo fotones. La absorción de luz por parte de estos pigmentos provoca que un electrón se mueva de su orbital molecular normal a uno de mayor energía, convirtiendo de este modo la energía de la luz solar en energía química. En las plantas los pigmentos fotosintéticos más abundantes son las **clorofilas** (Fig. 2.37), que juntas absorben la luz solar de todas las longitudes de onda excepto la verde. Pigmentos adicionales absorben la luz de otras longitudes de onda, así que básicamente el espectro completo de la luz visible puede ser capturado y utilizado para la fotosíntesis.

La energía capturada por la absorción de la luz se emplea para convertir el $H_2O$ en $O_2$ (Fig. 2.38). Los electrones de alta energía derivados de este proceso entran entonces en una cadena de transporte de electrones, en la que su transferencia por una serie de transportadores está acoplada a la síntesis de ATP. Además, estos electrones de alta energía reducen el $NADP^+$ a NADPH.

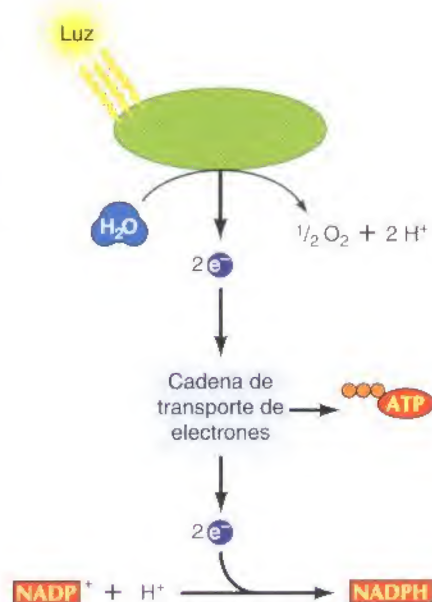



*Figura 2.38*
**Reacciones luminosas de la fotosíntesis.** La energía de la luz solar se emplea para escindir el $H_2O$ a $O_2$. Entonces los electrones de alta energía derivados de este proceso se transportan a través de una serie de transportadores y son empleados para convertir el $NADP^+$ en NADPH. La energía derivada de las reacciones de transporte de electrones también promueve la síntesis de ATP. Los detalles de estas reacciones se tratan en el Capítulo 10.

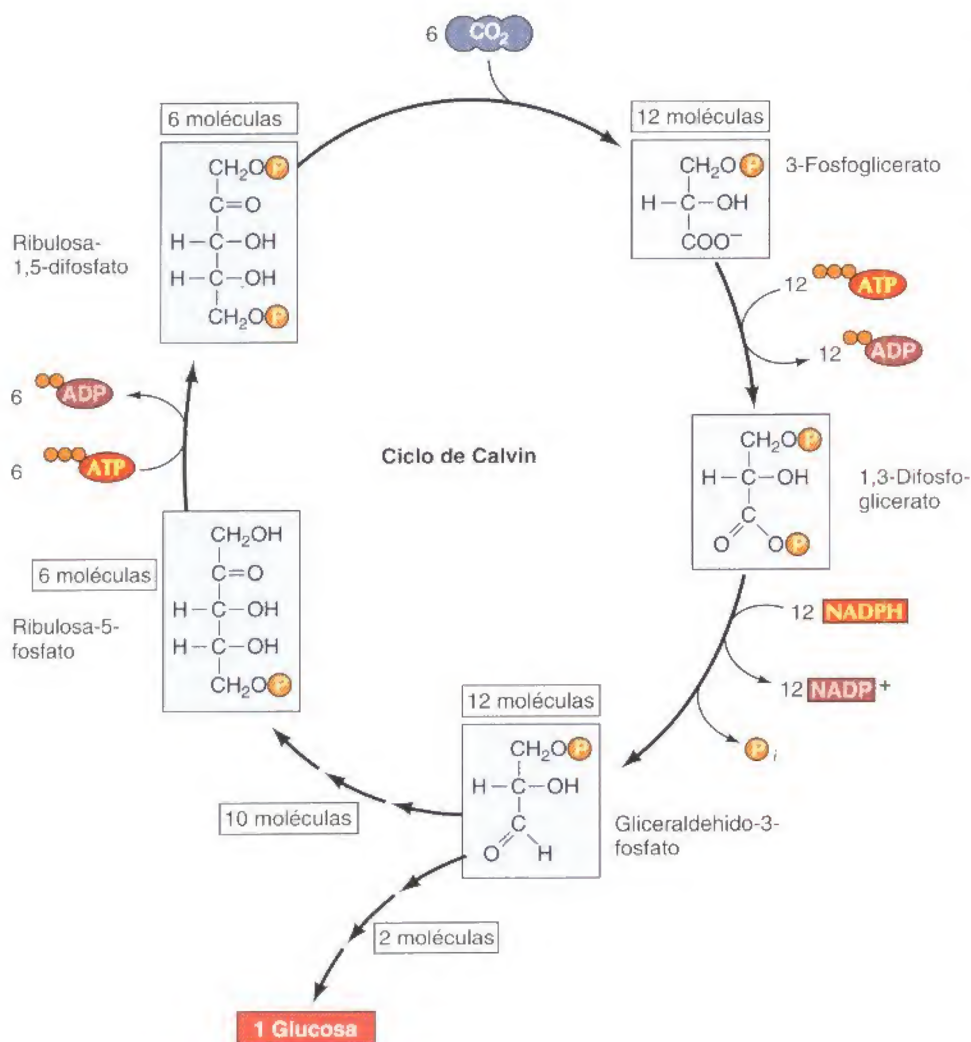



*Figura 2.39*
**Ciclo de Calvin.** Se muestra aquí la síntesis de una molécula de glucosa a partir de seis moléculas de $CO_2$. Cada molécula de $CO_2$ se añade a la ribulosa-1,5-difosfato para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Seis moléculas de $CO_2$ conducen de este modo a la formación de 12 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato al precio de 12 moléculas tanto de ATP como de NADPH. Dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato pueden emplearse entonces para sintetizar glucosa y diez moléculas continúan en el ciclo de Calvin para formar seis moléculas de ribulosa-5-fosfato. El ciclo se completa entonces con el uso adicional de seis moléculas de ATP para la síntesis de ribulosa-1,5-difosfato.

En las reacciones oscuras, el ATP y el NADPH producidos en las reacciones luminosas promueven la síntesis de carbohidratos a partir del $CO_2$ y $H_2O$. Las moléculas de $CO_2$ se añaden una a una a un ciclo de reacciones —conocidas como el **ciclo de Calvin**, en honor a su descubridor, Melvin Calvin— que conduce a la formación de carbohidratos (Fig. 2.39). En total, el ciclo de Calvin consume 18 moléculas de ATP y 12 de NADPH por cada molécula de glucosa sintetizada. Se necesitan dos electrones para convertir cada molécula de $NADP^+$ a NADPH, así que deben pasar 24 electrones por la cadena de transporte de electrones para generar suficiente NADPH para sintetizar una molécula de glucosa. Estos electrones se obtienen de la conversión de 12 moléculas de $H_2O$ a seis moléculas de $O_2$, lo que produce la formación de seis moléculas de $O_2$ por cada molécula de glucosa. No está claro, sin embargo, si el paso de estos mismos 24 electrones por la cadena de transporte de electrones es también suficiente para generar los 18 ATP que se requieren para el ciclo de Calvin. Algunos de estas moléculas de ATP pueden generarse en cambio por cadenas de transporte de electrones alternativas que utilizan la energía derivada de la luz solar para sintetizar ATP sin la síntesis de NADPH (véase Cap. 10).

## Biosíntesis de los componentes celulares

La sección anterior repasaba las principales reacciones metabólicas a través de las cuales la célula obtiene y almacena energía en forma de ATP. Esta energía metabólica se emplea entonces para realizar diversas tareas, incluyendo la sín-

tesis de macromoléculas y otros constituyentes celulares. De este modo, la energía derivada de la degradación de moléculas orgánicas (catabolismo) se utiliza para promover la síntesis de otros componentes necesarios de la célula. La mayoría de las vías catabólicas implican la oxidación de moléculas orgánicas acoplada a la generación tanto de energía (ATP) como de poder reductor (NADH). En contraste, las vías biosintéticas (anabólicas) generalmente implican la utilización tanto de ATP como de poder reductor (habitualmente en forma de NADPH) para la producción de nuevos compuestos orgánicos. Una vía biosintética importante, la síntesis de carbohidratos a partir de $CO_2$ y $H_2O$ durante las reacciones oscuras de la fotosíntesis, ya se trató en la sección anterior. Otras vías que conducen a la biosíntesis de los principales constituyentes celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) se revisan en las siguientes secciones.

### *Carbohidratos*

Además de obtenerse directamente de la alimentación o generada por la fotosíntesis, la glucosa puede sintetizarse a partir de otras moléculas orgánicas. En células animales, la síntesis de glucosa (**gluconeogénesis**) comienza habitualmente con lactato (producido en la glicolisis anaerobia), aminoácidos (derivados de la degradación de proteínas), o glicerol (producido en la degradación de lípidos). Las plantas (pero no los animales) también son capaces de sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos —un proceso que es especialmente importante durante la germinación de las semillas, cuando la energía almacenada como grasas debe ser transformada en carbohidratos para sustentar el crecimiento de la planta—. Tanto en células animales como vegetales, los azúcares simples son polimerizados y almacenados como polisacáridos.

La gluconeogénesis implica la conversión de piruvato en glucosa —esencialmente es lo inverso a la glicolisis. Sin embargo, como se ha tratado anteriormente, la conversión glucolítica de glucosa a piruvato es una vía productora de energía, generando dos moléculas de ATP y de NADH. Aunque algunas reacciones de la glicolisis son fácilmente reversibles, otras solamente se producirán en la dirección de la degradación de glucosa, porque están asociadas con un gran descenso en la energía libre. Estas reacciones energéticamente favorables de la glicolisis son puenteadas durante la gluconeogénesis por otras reacciones (catalizadas por enzimas diferentes) que están acopladas al consumo de ATP y NADH para poder conducirlas en la dirección de la síntesis de glucosa. En total, la generación de glucosa a partir de dos moléculas de piruvato requiere de cuatro moléculas de ATP, dos de GTP y dos de NADH. Este proceso es considerablemente más costoso que la simple inversión de la glicolisis (que requeriría dos moléculas de ATP y dos de NADH), demostrando la necesidad de energía adicional para conducir la vía en la dirección de la biosíntesis.

Tanto en las células animales como en las vegetales, la glucosa se almacena en forma de polisacáridos (glucógeno y almidón, respectivamente). La síntesis de polisacáridos, como la del resto de macromoléculas, es una reacción que requiere energía. Como se observa anteriormente, la unión de dos azúcares por un enlace glucosídico puede describirse como una reacción de deshidratación, donde se retira $H_2O$ (véase Fig. 2.3). Dicha reacción, sin embargo, es energéticamente desfavorable y por lo tanto incapaz de progresar en la dirección directa. En consecuencia, la formación de un enlace glucosídico debe estar acoplada a una reacción productora de energía, que se consigue empleando azúcares nucleotídicos como intermediarios en la síntesis de polisacáridos (Fig. 2.40). En primer lugar, la glucosa se fosforila en una reacción promovida por ATP a glucosa-6-fosfato, que entonces se convierte en glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato reacciona con UTP (uridín trifosfato), produciendo UDP-glucosa más pirofosfato, que se hidroliza a fosfato con la liberación de energía libre adicional. La UDP-glucosa es un intermediario activado que entonces dona su residuo de

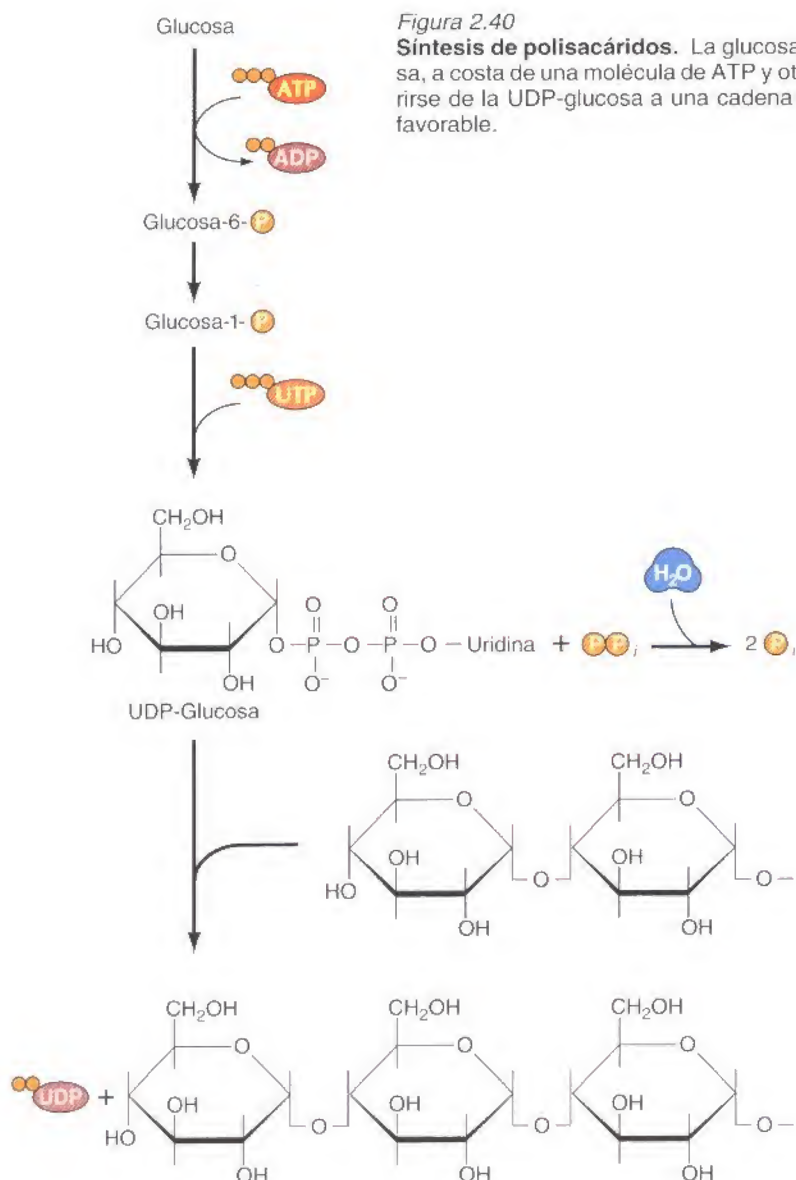



*Figura 2.40*
**Síntesis de polisacáridos.** La glucosa se convierte primero en una forma activada, UDP-glucosa, a costa de una molécula de ATP y otra de UTP. El residuo de glucosa entonces puede transferirse de la UDP-glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable.

glucosa a una cadena polisacárida creciente en una reacción energéticamente favorable. De este modo, la energía química en forma de ATP y UTP promueve la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

### Lípidos

Los lípidos son importantes moléculas de depósito de energía y los componentes principales de las membranas celulares. Se sintetizan a partir de acetil-CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos, en una serie de reacciones que se parecen a la inversa de la oxidación de ácidos grasos. Como en la biosíntesis de carbohidratos, sin embargo, las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos grasos difieren de las implicadas en su degradación y son impulsadas en la dirección de la biosíntesis acoplándose al consumo tanto de energía en forma de ATP como de poder reductor en forma de NADPH. Los ácidos grasos se sintetizan al añadir paso a paso unidades de dos carbonos derivados de acetil-CoA a una cadena creciente. La adición de cada una de estas unidades de dos carbonos requiere del gasto de una molécula de ATP y dos moléculas de NADPH.

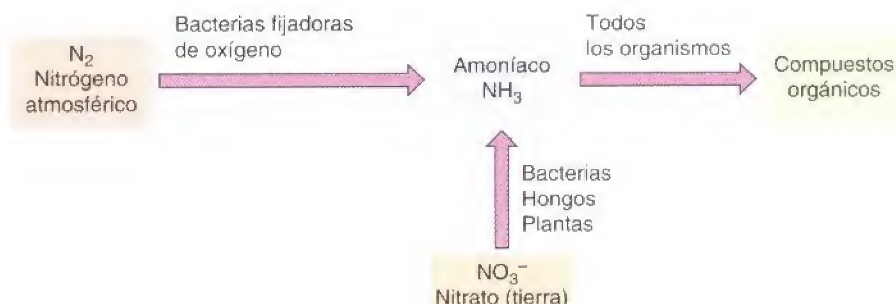



*Figura 2.41*
**Asimilación de nitrógeno a los compuestos orgánicos.** El amoníaco se incorpora a los compuestos orgánicos en todos los organismos. Algunas bacterias son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en amoníaco, y la mayoría de las bacterias, hongos y plantas pueden utilizar el nitrato de la tierra.

**TABLA 2.2.** Requerimientos dietéticos de aminoácidos en el hombre

| Esencial | No esencial |
|---|---|
| Histidina | Alanina |
| Isoleucina | Arginina[a] |
| Leucina | Asparragina |
| Lisina | Aspartato |
| Metionina | Cisteína |
| Fenilalanina | Glutamato |
| Treonina | Glutamina |
| Triptófano | Glicina |
| Valina | Prolina |
| | Serina |
| | Tirosina |

Los aminoácidos esenciales deben obtenerse de la dieta; los aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados por células humanas.
[a]Aunque la arginina se clasifica como un aminoácido no esencial, los niños en crecimiento deben tener un aporte de arginina adicional en su dieta.

El principal producto de la biosíntesis de ácidos grasos, que sucede en el citoplasma de las células eucariotas, es el palmitato, ácido graso de 16 carbonos. Entonces, los principales componentes de las membranas celulares (fosfolípidos, esfingomielina, y glucolípidos) se sintetizan a partir de ácidos grasos libres en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (véase Cap. 9).

## *Proteínas*

A diferencia de los carbohidratos y los lípidos, las proteínas (así como los ácidos nucleicos) contienen nitrógeno además de carbono, hidrógeno y oxígeno. El nitrógeno se incorpora a los compuestos orgánicos a partir de fuentes diferentes en diferentes organismos (Fig. 2.41). Algunas bacterias pueden usar $N_2$ atmosférico por un proceso denominado **fijación de nitrógeno**, en el que $N_2$ se reduce a $NH_3$ a expensas de energía en forma de ATP. Aunque relativamente pocas especies de bacterias son capaces de fijar nitrógeno, la mayoría de las

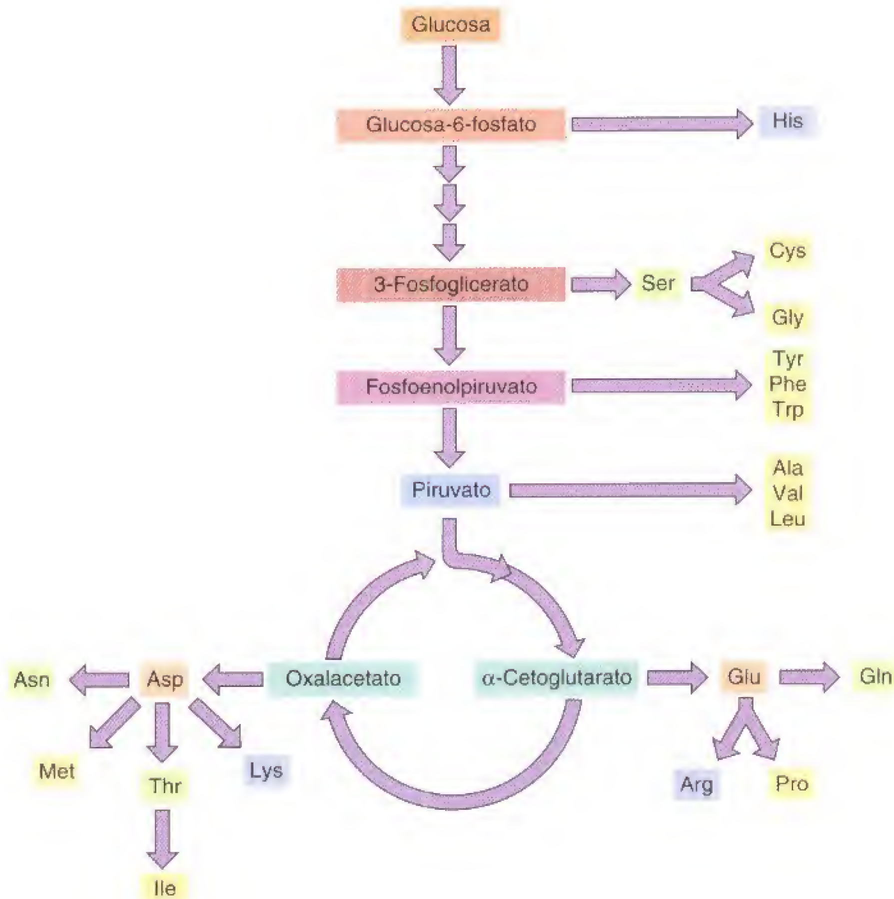
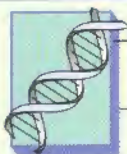



*Figura 2.42*
**Biosíntesis de los aminoácidos.** Los esqueletos carbonados de los aminoácidos se obtienen a partir de intermediarios de la glucolisis y del ciclo del ácido cítrico.



## Medicina molecular

### *Fenilcetonuria*

#### La enfermedad

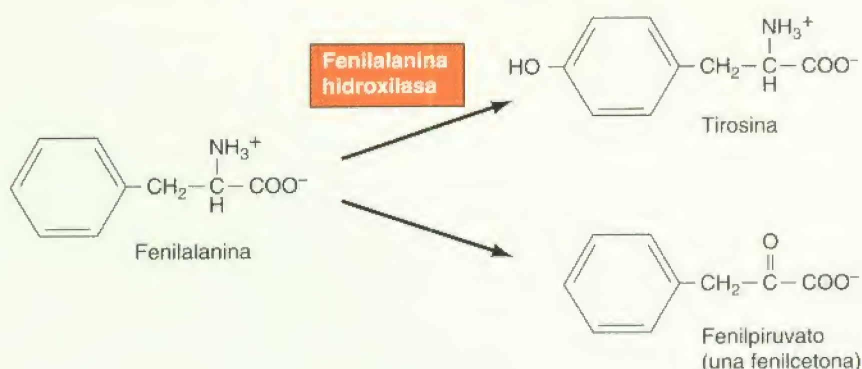
La fenilcetonuria, o FCN, es un error congénito del metabolismo de los aminoácidos con efectos devastadores. Afecta aproximadamente a uno de cada 10.000 recién nacidos y, si no se trata, provoca un retraso mental severo. Afortunadamente, el conocimiento de la naturaleza del defecto responsable de la fenilcetonuria ha permitido su diagnóstico precoz y tratamiento eficaz.

#### Bases moleculares y celulares

La fenilcetonuria se debe a una deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa, que convierte la fenilalanina en tirosina. Esta deficiencia provoca que la fenilalanina se acumule a niveles muy altos y sufra otras reacciones, como la conversión en fenilpiruvato. La fenilalanina, el fenilpiruvato, y otros metabolitos anormales se acumulan en la sangre y son excretados a niveles altos en la orina (el nombre de la enfermedad procede de los altos niveles de fenilpiruvato, una fenilcetona, encontrados en la orina de los niños afectados). Aunque la causa bioquímica precisa no se conoce, el retraso mental es una consecuencia crucial del acúmulo de estos metabolitos anormales de la fenilalanina.

#### Prevención y tratamiento

La deficiencia enzimática no produce dificultades mientras el feto está en el útero, así que los niños con fenilcetonuria son normales al nacer. Si no son tratados, sin embargo, los niños afectados se vuelven permanente y profundamente retrasados en el primer año de vida. Afortunadamente, los recién nacidos con fenilcetonuria pueden ser fácilmente identificados por pruebas rutinarias de detección precoz que detectan niveles elevados de fenilalanina en sangre. El retraso mental se puede prevenir alimentando a los niños afectados con una dieta sintética baja en fenilalanina. Este tratamiento dietético elimina el acúmulo de metabolitos tóxicos de la fenilalanina y previene eficazmente el retraso mental que se produciría de otro modo. La detección precoz rutinaria de la fenilcetonuria es por lo tanto una prueba crucial en todos los recién nacidos.




Metabolismo anormal de la fenilalamina en pacientes con fenilcetonuria.

bacterias, hongos, y plantas pueden usar nitrato ($NO_3^-$), que es un componente frecuente de la tierra, reduciéndolo a $NH_3$ gracias a los electrones derivados del NADH o NADPH. Finalmente, todos los organismos son capaces de incorporar amoníaco ($NH_3$) a componentes orgánicos.

El $NH_3$ se incorpora a las moléculas orgánicas principalmente durante la síntesis de los aminoácidos glutamato y glutamina, que se obtienen a partir del intermediario del ciclo del ácido cítrico, $\alpha$-cetoglutarato. Estos aminoácidos funcionan después como donantes de grupos amino durante la síntesis de los otros aminoácidos, que también se producen a partir de otras vías metabólicas centrales, como la glicolisis o el ciclo del ácido cítrico (Fig. 2.42). Así el material básico para la síntesis de aminoácidos se obtiene de la glucosa, y los aminoácidos se sintetizan a costa de energía (ATP) y de poder reductor (NADPH). Muchas bacterias y plantas pueden sintetizar todos los 20 aminoácidos. Los humanos y otros mamíferos, sin embargo, sólo pueden sintetizar aproximadamente la mitad de los aminoácidos que requieren; el resto debe obtenerse de la dieta (Tabla 2.2).

La polimerización de los aminoácidos para formar proteínas también requiere energía. Como la síntesis de polisacáridos, la formación de un enlace peptídico puede considerarse como una reacción de deshidratación, que debe realizarse en la dirección de la síntesis de proteínas acoplándose a otra fuente de

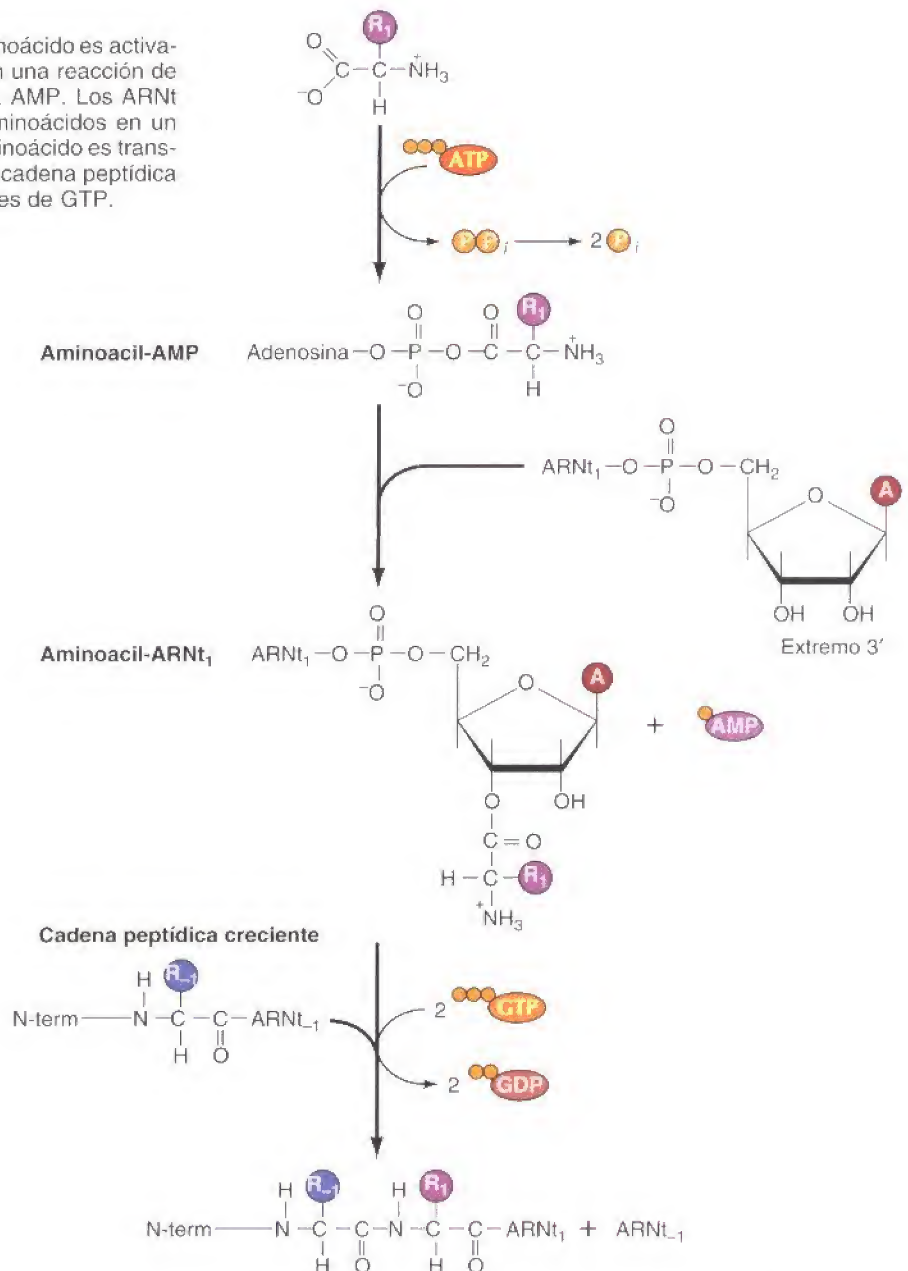
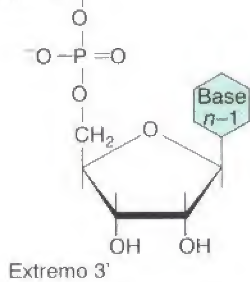



*Figura 2.43*
**Formación de un enlace peptídico.** Un aminoácido es activado primero a través de la unión a su ARNt en una reacción de dos pasos que implica la hidrólisis de ATP a AMP. Los ARNt sirven cono adaptadores para alinear loa aminoácidos en un molde de ARNm unido a ribosomas. Cada aminoácido es transferido entonces al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente a costa de dos moléculas adicionales de GTP.

energía metabólica. En la biosíntesis de polisacáridos, este acoplamiento se consigue a través de la conversión de los azúcares a intermediarios activados, como la UDP-glucosa. Los aminoácidos son activados de forma similar antes de utilizarse para la síntesis de proteínas.

Una diferencia crucial entre la síntesis de proteínas y la de polisacáridos es que los aminoácidos se incorporan a las proteínas en un orden particular, especificado por un gen. El orden de los nucleótidos en un gen especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína a través de la traducción, en la que el ARN mensajero (ARNm) actúa como molde para la síntesis proteínica (véase Cap. 3). Cada aminoácido se une primero a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específica en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP (Fig. 2.43). Entonces los aminoacil ARNt se alinean en el molde de ARNm unido a los ribosomas, y cada aminoácido se añade al extremo C terminal de una cadena peptídica creciente por medio de una serie de reacciones que serán tratadas en detalle en el Capítulo 7. Durante el proceso, se hidrolizan dos moléculas adicio-



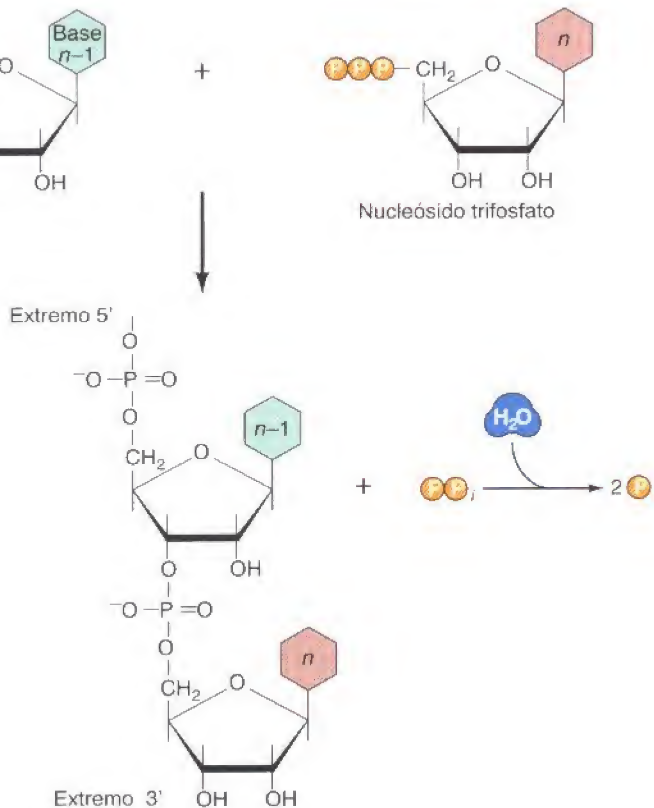




*Figura 2.44*
**Síntesis de polinucleótidos.** Nucleósidos trifosfato se unen al extremo 3' de una cadena polinucleotídica creciente con la liberación de pirofosfato.

nales de GTP, así que la incorporación de cada aminoácido a una proteína está acoplada a la hidrólisis de una molécula de ATP y dos de GTP.

### *Ácidos nucleicos*

Los precursores de los ácidos nucleicos, los nucleótidos, están compuestos de azúcares de cinco carbonos fosforilados unidos a bases nucleicas. Los nucleótidos pueden ser sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos; también pueden ser obtenidos de la dieta o reutilizados tras la degradación de ácidos nucleicos. El punto de partida para la biosíntesis de nucleótidos es el azúcar fosforilado ribosa-5-fosfato, que se obtiene a partir de glucosa-6-fosfato. Vías divergentes conducen entonces a la síntesis de ribonucleótidos de purina y pirimidina, que son los precursores inmediatos de la síntesis de ARN. Estos ribonucleótidos se convierten en desoxirribonucleótidos, que sirven como ladrillos de construcción monoméricos del ADN.

El ARN y ADN son polímeros de nucleósidos monofosfato. Como para otras macromoléculas, sin embargo, la polimerización directa de nucleósidos monofosfato es energéticamente desfavorable, y la síntesis de polinucleótidos utiliza en su lugar nucleósidos trifosfatos como precursores activados (Fig. 2.44). Un nucleósido 5'-trifosfato se añade a un grupo 3' hidroxilo de una cadena polinucleotídica creciente, con la liberación y posterior hidrólisis de pirofosfato como promotor de la reacción en la dirección de la síntesis de polinucleótidos.

## Membranas celulares

La estructura y función de las células dependen de forma crucial de las membranas, que no sólo separan el interior de la célula de su entorno sino que tam-

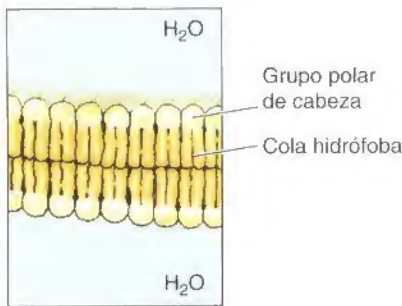



*Figura 2.45*
**Bicapa fosfolipídica.** Los fosfolípidos forman espontáneamente bicapas estables, con sus grupos polares de cabeza expuestos al agua y sus colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana.

bién definen los compartimentos internos de las células eucariotas, incluyendo las organelas de núcleo y citoplasma. La formación de membranas biológicas se basa en las propiedades de los lípidos, y todas las membranas celulares comparten una misma organización estructural: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas. Estas proteínas de membrana son responsables de muchas funciones especializadas; algunas actúan como receptores que permiten a la célula responder a señales externas, algunas son responsables del transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, y otras participan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. Además, las proteínas de membrana controlan las interacciones entre células de organismos pluricelulares. La organización estructural común de las membranas subyace de este modo en una gran variedad de procesos biológicos y funciones especializadas de membrana, que se tratarán con detalle en otros capítulos.

## *Lípidos de membrana*

Los bloques de construcción fundamentales de todas las membranas celulares son los fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas, que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos ligadas a un grupo de cabeza hidrófilo que contiene fosfato (véase Fig. 2.7). Debido a que sus colas de ácidos grasos son escasamente solubles en agua, los fosfolípidos forman bicapas espontáneamente en soluciones acuosas, con las colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana y los grupos polares de cabeza expuestos en ambos lados, en contacto con el agua (Fig. 2.45). Dichas **bicapas fosfolipídicas** forman una barrera estable entre dos compartimentos acuosos y representan la estructura básica de todas las membranas biológicas.

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50 % de la masa de la mayoría de las membranas celulares, aunque esta proporción varía dependiendo del tipo de membrana. Las membranas plasmáticas, por ejemplo, son aproximadamente un 50 % de lípidos y 50 % de proteínas. La membrana interna de la mitocondria, por otra parte, contiene una fracción inusualmente alta (aproximadamente 75 %) de proteínas, reflejando la abundancia de complejos proteínicos implicados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. La composición lipídica de las diferentes membranas celulares también varía (Tabla 2.3). La membrana plasmática de *E. coli* contiene predominantemente fosfatidiletanolamina, que constituye el 80 % del total de lípidos. Las membranas plasmáticas de los mamíferos son más complejas, conteniendo cuatro fosfolípidos principales —fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, y esfingomielina— que juntos constituyen entre el 50 % y el 60 % del total de lípidos de membrana. Además de los fosfolípidos, la membrana plasmática de las células animales contiene glucolípidos y colesterol, que generalmente corresponden a aproximadamente el 40 % de las moléculas de lípidos totales.

*Figura 2.46*
**Movilidad de los fosfolípidos en una membrana.** Fosfolípidos individuales pueden rotar y moverse lateralmente dentro de una bicapa.

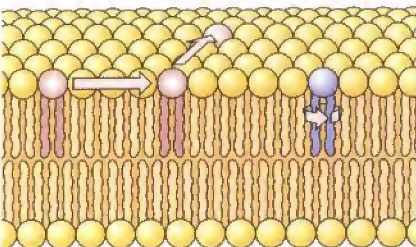
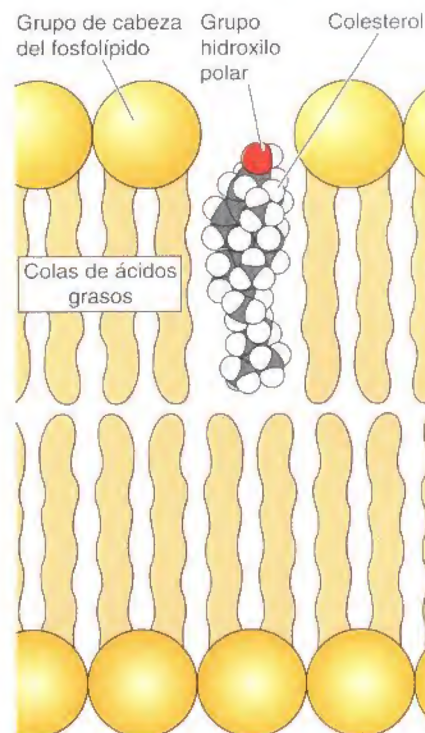


**TABLA 2.3.** Composición lipídica de las membranas celulares[a]

| Lípido | Membrana plasmática: *E. coli* | Membrana plasmática: Eritrocito | Retículo endoplasmático rugoso | Membranas mitocondriales externas |
|---|---|---|---|---|
| Fosfatidilcolina | 0 | 17 | 55 | 50 |
| Fosfatidilserina | 0 | 6 | 3 | 2 |
| Fosfatidiletanolamina | 80 | 16 | 16 | 23 |
| Esfingomielina | 0 | 17 | 3 | 5 |
| Glucolípidos | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Colesterol | 0 | 45 | 6 | <5 |

*Fuente:* Datos de P.L.Yeagle, 1993. *The Membranes of Cells*, 2nd ed. San Diego, CA:Academic Press.
[a] La composición de la membrana está indicada como el porcentaje molar de los principales lípidos constituyentes.

*Figura 2.47*
**Inserción de colesterol en una membrana.** El colesterol se inserta en la membrana con su grupo hidroxilo polar próximo a los grupos polares de cabeza de los fosfolípidos.




Una importante propiedad de las bicapas lipídicas es que se comportan como fluidos bidimensionales en los que moléculas individuales (tanto lípidos como proteínas) son libres para rotar y moverse en direcciones laterales (Fig. 2.46). Esta fluidez es una propiedad crucial de las membranas y esta determinada tanto por la temperatura como por la composición lipídica. Por ejemplo, las interacciones entre cadenas más cortas de ácidos grasos son más débiles que aquellas entre cadenas más largas, así que las membranas que contienen cadenas de ácidos grasos más cortas son menos rígidas y se mantienen fluidas a temperaturas más bajas. Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados incrementan de forma similar la fluidez de la membrana porque la presencia de dobles enlaces introduce curvamientos en las cadenas de ácidos grasos, haciendo más difícil que se empaqueten juntas.

Debido a su estructura de anillo hidrocarbonado (véase Fig. 2.9), el colesterol desempeña un papel importante en la determinación de la fluidez de la membrana. Las moléculas de colesterol se insertan en la bicapa con sus grupos polares hidroxilo próximos a los grupos de cabeza hidrofílicos de los fosfolípidos (Fig. 2.47) Los anillos hidrocarbonados rígidos del colesterol interactúan por lo tanto con las regiones de las cadenas de ácidos grasos que son adyacentes a los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Esta interacción disminuye la movilidad de las porciones externas de las cadenas de ácidos grasos, haciendo que esta parte de la membrana sea más rígida. Por otra parte, la inserción del colesterol interfiere con las interacciones entre cadenas de ácidos grasos, manteniendo de este modo la fluidez de la membrana a temperaturas más bajas.

### *Proteínas de membrana*

Las proteínas son el otro constituyente principal de las membranas celulares, constituyendo entre el 25 y el 75 % de la masa de las diversas membranas de la célula. El modelo actual de la estructura de la membrana, propuesto por Jonathan Singer y Garth Nicolson en 1972, considera las membranas como un **mosaico fluido** en el que las proteínas están insertadas en una bicapa lipídica (Fig. 2.48). Mientras los fosfolípidos proporcionan la organización estructural básica de las membranas, las proteínas de membrana desempeñan las funciones específicas de las diferentes membranas de la célula. Estas proteínas se dividen en dos tipos generales, basándose en la naturaleza de su asociación con la membrana. Las **proteínas integrales de membrana** están embebidas directamente dentro de la bicapa lipídica. Las **proteínas periféricas de membrana** no están insertadas en la bicapa lipídica pero están asociadas con la membrana indirectamente, generalmente a través de interacciones con las proteínas integrales de membrana.

Muchas proteínas integrales de membrana (llamadas **proteínas transmembrana**) atraviesan la bicapa lipídica, con partes expuestas en ambos lados de la membrana. Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana son habitualmente regiones $\alpha$-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos no polares. Las cadenas laterales hidrófobas de estos aminoácidos interaccionan con las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de membrana, y la formación de una $\alpha$-hélice neutraliza el carácter polar de los enlaces peptídicos, como se discute previamente en este Capítulo con respecto al plegamiento de las proteínas. La única otra estructura proteica conocida que atraviesa bicapas lipídicas es el **barril-$\beta$**, formada por el plegamiento de láminas-$\beta$ en una estructura semejante a un barril, que se encuentra en algunas proteínas transmembrana de bacterias, cloroplastos, y mitocondrias (Fig. 2.49). Como los fosfolípidos, las proteínas transmembrana son moléculas anfipáticas, con sus partes hidrófilas

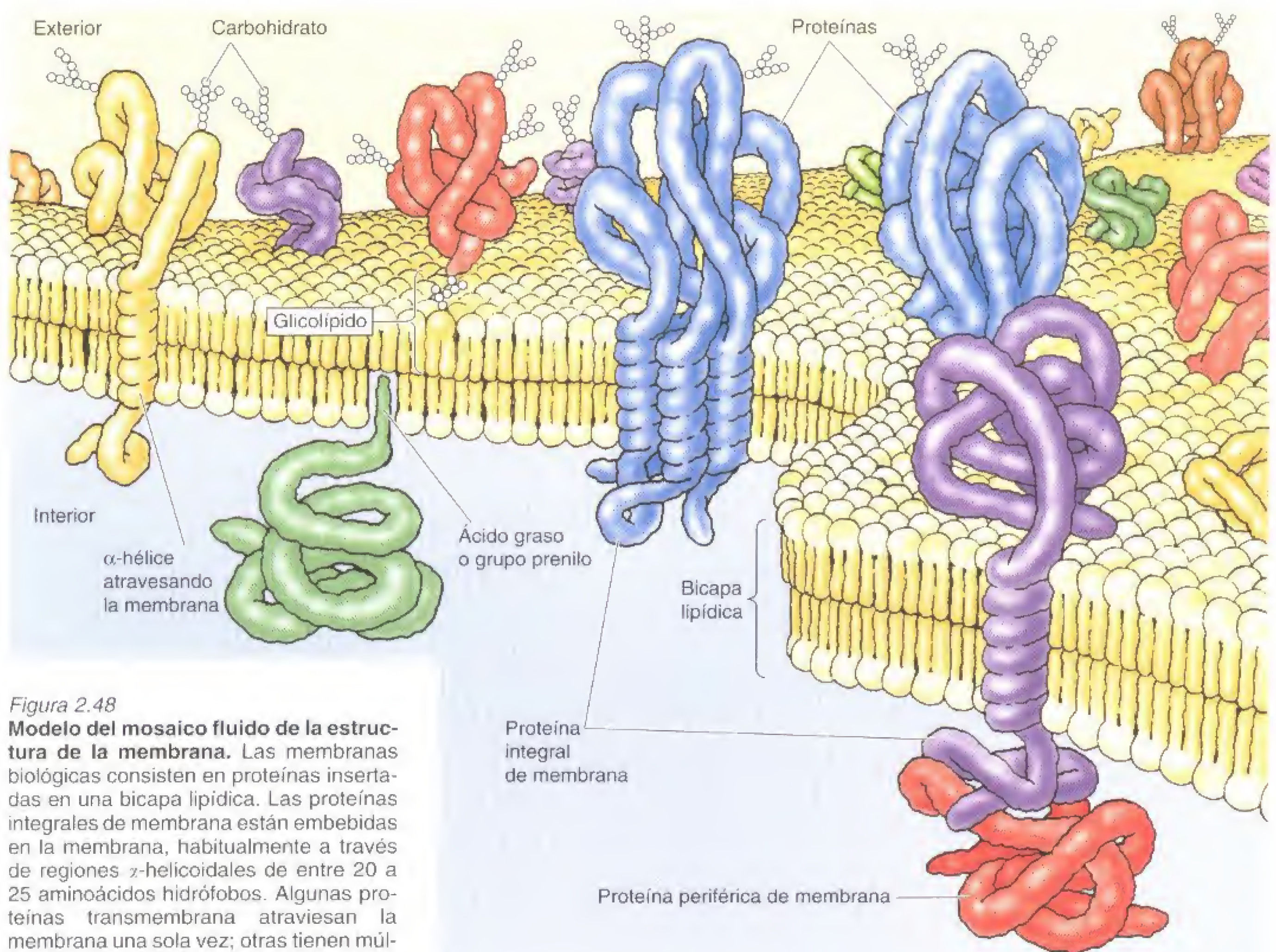



*Figura 2.48*
**Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana.** Las membranas biológicas consisten en proteínas insertadas en una bicapa lipídica. Las proteínas integrales de membrana están embebidas en la membrana, habitualmente a través de regiones α-helicoidales de entre 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están ancladas en la membrana a través de lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica. Estas proteínas pueden estar ancladas a la vertiente extracelular de la membrana por glicolípidos o a la vertiente citosólica por ácidos grasos o grupos prenilo (véase las estructuras en el Cap. 7). Las proteínas periféricas de membrana no están insertadas en la membrana pero están adheridas a través de interacciones con proteínas integrales de membrana.

expuestas al medio acuoso a ambos lados de la membrana. Algunas proteínas transmembrana atraviesan la membrana una sola vez; otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. La mayoría de las proteínas transmembrana de las membranas plasmáticas eucariotas han sido modificadas con la adición de carbohidratos, que están expuestos en la superficie de la célula y pueden participar en interacciones célula-célula.

Las proteínas también pueden estar ancladas en las membranas por lípidos que están ligados de forma covalente a la cadena polipeptídica (véase Cap. 7). Modificaciones lipídicas específicas anclan proteínas a las vertientes citosólica y extracelular de la membrana plasmática. Las proteínas pueden estar ancladas a la vertiente citosólica de la membrana bien por la adición de un ácido graso de 14 carbonos (ácido mirístico) a su extremo amino terminal o bien por la adición de un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico) o de grupos prenilo de 15 ó 20 carbonos a las cadenas laterales de los residuos de cisteína. De forma alternativa, las proteínas son ancladas a la vertiente extracelular de la membrana plasmática a través de la adición de glicolípidos a su extremo carboxilo terminal.

## *Transporte a través de membranas celulares*

La permeabilidad selectiva de las membranas biológicas a las moléculas pequeñas permite a la célula controlar y mantener su composición interna. Sólo

las moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de las bicapas de fosfolípidos (Fig. 2.50). Las moléculas pequeñas no polares, como el $O_2$ y el $CO_2$, son solubles en la bicapa lipídica y por lo tanto pueden cruzar fácilmente las membranas celulares. Las moléculas polares pequeñas no cargadas, como el $H_2O$, también pueden difundir a través de las membranas, pero moléculas polares no cargadas mayores, como la glucosa, no pueden. Las moléculas cargadas, como los iones, son incapaces de difundir a través de una bicapa de fosfolípidos independientemente de su tamaño; incluso los iones $H^+$ no pueden cruzar una bicapa lipídica por difusión libre.

Aunque los iones y la mayoría de las moléculas polares no pueden difundir a través de una bicapa lipídica, muchas de estas moléculas (como la glucosa) son capaces de atravesar las membranas celulares. Estas moléculas pasan a través de las membranas gracias a la actuación de proteínas específicas transmembrana, que actúan como transportadores. Dichas proteínas de transporte determinan la permeabilidad selectiva de las membranas celulares y de este modo desempeñan un papel crucial en la función de la membrana. Contienen múltiples regiones que atraviesan la membrana formando un conducto a través de la bicapa lipídica, permitiendo que moléculas polares o cargadas atraviesen la membrana por un poro proteínico sin interaccionar con las cadenas hidrófobas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

Como se trata en detalle en el Capítulo 12, hay dos tipos principales de proteínas de transporte de membrana (Fig. 2.51). Los **canales proteínicos** forman poros abiertos a través de la membrana, permitiendo libremente el paso de cualquier molécula del tamaño adecuado. Los canales iónicos, por ejemplo, permiten el paso de iones inorgánicos como $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$, y $Cl^-$ a través de la membrana plasmática. Una vez abiertos, los canales proteínicos forman poros pequeños a través de los cuales pueden cruzar la membrana por difusión libre iones del tamaño y carga adecuados. Los poros formados por estos canales proteínicos no están permanentemente abiertos; más bien, pueden ser abiertos o cerrados selectivamente en respuesta a señales extracelulares, permitiendo a la célula controlar el movimiento de iones a través de la membrana. Estos canales iónicos regulados han sido estudiados especialmente bien en células nerviosas y musculares, donde median la transmisión de señales electroquímicas.

En contraste con los canales proteínicos, las **proteínas transportadoras** unen y transportan selectivamente moléculas pequeñas específicas, como la glucosa. En vez de formar canales abiertos, las proteínas de transporte actúan

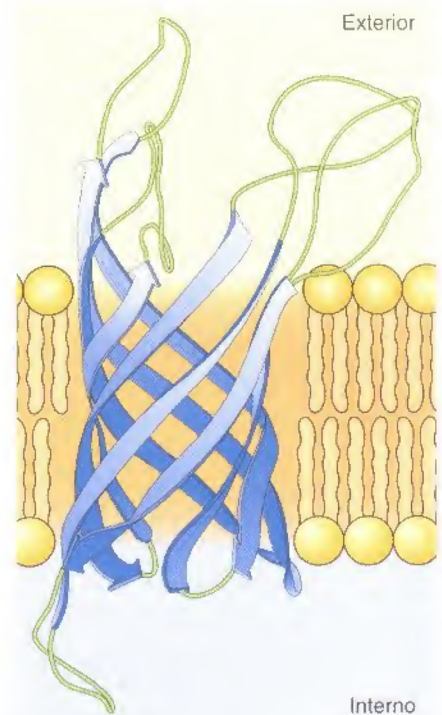



*Figura 2.49*
**Estructura de un barril-$\beta$.** Algunas proteínas transmembrana atraviesan la bicapa fosfolipídica como láminas-$\beta$ plegadas en una estructura semejante a un barril.

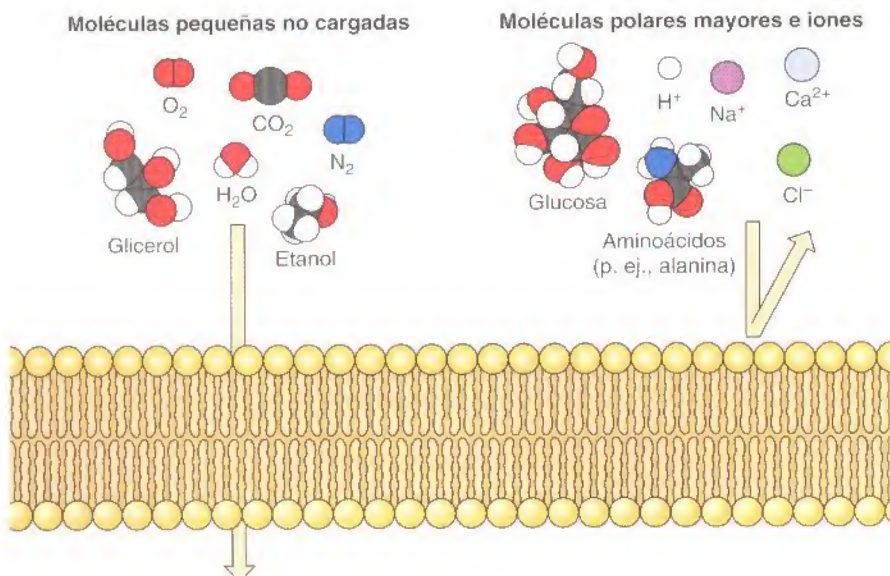



*Figura 2.50*
**Permeabilidad de las bicapas de fosfolípidos.** Moléculas pequeñas no cargadas pueden difundir libremente a través de una bicapa de fosfolípidos. Sin embargo, la bicapa es impermeable a moléculas polares mayores (como la glucosa y los aminoácidos) y a los iones.

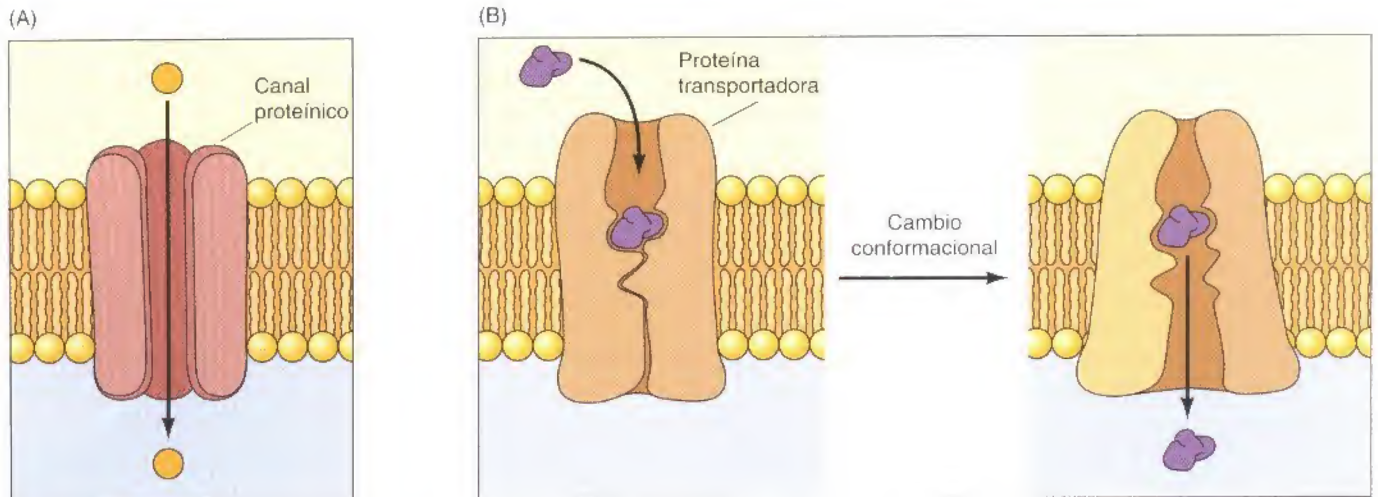
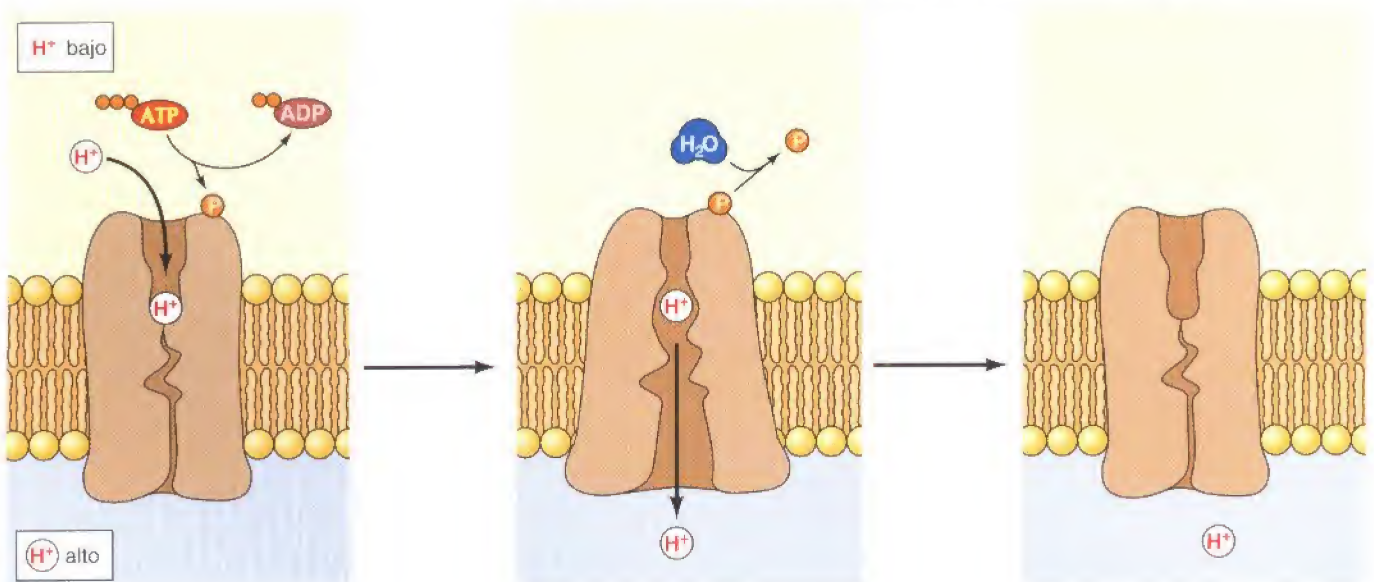



*Figura 2.51*
**Canales proteínicos y proteínas de transporte.** (A) Los canales proteínicos forman poros abiertos a través de los cuales las moléculas del tamaño apropiado (p. ej., iones) pueden cruzar la membrana. (B) Las proteínas transportadoras unen selectivamente las pequeñas moléculas que serán transportadas y entonces experimentan un cambio conformacional para liberar la molécula al otro lado de la membrana.

como enzimas para facilitar el paso de moléculas específicas a través de las membranas. En particular, las proteínas de transporte unen moléculas específicas y después experimentan cambios conformacionales que abren canales a través de los cuales la molécula que será transportada puede pasar a través de la membrana y ser liberada en el otro lado.

Como se describe hasta ahora, las moléculas transportadas bien a través de canales proteínicos o de proteínas transportadoras cruzan las membranas en la dirección energéticamente favorable, determinada por los gradientes de concentración y electroquímico —un proceso conocido como **transporte pasivo**. Sin embargo, las proteínas transportadoras también proporcionan un mecanismo a través del cual los cambios energéticos asociados con el transporte de moléculas a través de una membrana puede ser acoplado a la utilización o

*Figura 2.52*
**Modelo de transporte activo.** La energía derivada de la hidrólisis de ATP es empleada para transportar $H^+$ en contra de un gradiente electroquímico (de una baja a una alta concentración de $H^+$). La unión de $H^+$ está acompañada por la fosforilación de la proteína de transporte, lo que induce un cambio conformacional que promueve el transporte de $H^+$ contra el gradiente electroquímico. La liberación de $H^+$ y la hidrólisis del grupo fosfato ligado restablecen entonces el transportador a su conformación original.



producción de otras formas de energía metabólica, igual que las reacciones enzimáticas pueden ser acopladas a la hidrólisis o síntesis de ATP. Por ejemplo, las moléculas pueden ser transportadas en una dirección energéticamente desfavorable a través de una membrana (p. ej., contra un gradiente de concentración) si su transporte en esa dirección esta acoplado a la hidrólisis de ATP como fuente de energía —un proceso denominado **transporte activo** (Fig. 2.52)—. La energía libre almacenada como ATP puede de este modo ser usada para controlar la composición interna de la célula, así como para promover la biosíntesis de los componentes celulares.

| RESUMEN | PALABRAS CLAVE |
|---|---|
| **COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LAS CÉLULAS** | |
| ***Carbohidratos***: Los carbohidratos incluyen azúcares simples y polisacáridos. Los polisacáridos sirven como formas de almacenamiento de azúcares, componentes estructurales de las células y marcadores en procesos de reconocimiento celular. | **carbohidrato, monosacárido, enlace glicosídico, oligosacárido, polisacárido, glucógeno, almidón, celulosa** |
| ***Lípidos***: Los lípidos son los principales componentes de las membranas celulares, y sirven como depósito de energía y moléculas de señalización. Los fosfolípidos consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos unidas a un grupo hidrófilo de cabeza que contiene fosfato. | **lípido, ácido graso, triacilglicerol, grasa, fosfolípido, esfingomielina, anfipático, glicolípido, colesterol, hormona esteroidea** |
| ***Ácidos nucleicos***: Los ácidos nucleicos son las principales moléculas de información de la célula. Tanto el ADN como el ARN son polímeros de nucleótidos de purina y pirimidina. Los enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias permiten a los ácidos nucleicos dirigir su propia replicación. | **ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico, ARN de transferencia, nucleótido, purina, pirimidina, adenina, guanina, citosina timina, uracilo, 2'-desoxirribosa, ribosa, nucleósido, enlace fosfodiester, oligonucleótido, polinucleótido** |
| ***Proteínas***: Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos distintos, cada uno de los cuales tiene una cadena lateral distinta con propiedades químicas específicas. Cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos propia, que determina su estructura tridimensional. En la mayoría de las proteínas, combinaciones de $\alpha$-hélices y hojas $\beta$ se pliegan en dominios globulares con aminoácidos hidrófobos en el interior y aminoácidos hidrófilos en la superficie. | **proteína, aminoácido, enlace peptídico polipéptido, cristalografía de rayos X, estructura primaria, estructura secundaria, $\alpha$-hélice, hoja $\beta$, estructura terciaria, dominio, estructura cuaternaria** |
| **PAPEL CENTRAL DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS** | |
| ***Actividad catalítica de las enzimas***: Prácticamente todas las reacciones químicas dentro de las células son catalizadas por enzimas. | **enzima, sustrato, producto, estado de transición, energía de activación, sitio activo** |
| ***Mecanismos de catálisis enzimática***: Las enzimas incrementan la velocidad de las reacciones uniendo sustratos en la posición adecuada, alterando la conformación de los sustratos para aproximarlos al estado de transición, y participando directamente en las reacciones químicas. | **modelo de la llave y la cerradura, ajuste inducido** |
| ***Coenzimas***: Las coenzimas trabajan junto con las enzimas para transportar grupos bioquímicos entre sustratos. | **grupo prostético, coenzima, nicotidamín adenín dinucleótido ($NAD^+$)** |
| ***Regulación de la actividad enzimática***: Las actividades de las enzimas son reguladas para cubrir las necesidades fisiológicas de la célula. La actividad enzimática puede ser controlada a través de la unión de moléculas pequeñas, de interacciones con otras proteínas, y de modificaciones covalentes. | **inhibición por retroalimentación, regulación alostérica, fosforilación** |

## ENERGÍA METABÓLICA

energía libre de Gibbs (*G*), adenosín 5'trifosfato (ATP), enlace de alta energía

***Energía libre y ATP***: El ATP funciona como un depósito de energía libre, que es empleado para promover reacciones que requieren energía dentro de las células.

glicolisis, coenzima A (CoA), ciclo del ácido cítrico, ciclo de Krebbs, flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$), fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones

***Generación de ATP a partir de glucosa***: La degradación de glucosa es una fuente importante de energía celular. En células aeróbicas, la oxidación completa de la glucosa produce entre 36 y 38 moléculas de ATP. La mayoría de este ATP se deriva de las reacciones de transporte de electrones en las que el $O_2$ es reducido a $H_2O$.

***Obtención de energía de otras moléculas orgánicas***: El ATP también puede ser obtenido a partir de la degradación de otras moléculas orgánicas aparte de la glucosa. Debido a que las grasas están más reducidas que los carbohidratos, proporcionan una fuente más eficaz de almacenamiento de energía.

reacciones luminosas, reacciones oscuras, pigmentos fotosintéticos, clorofila, ciclo de Calvin

***Fotosíntesis***: La energía requerida para la síntesis de moléculas orgánicas se obtiene en último término de la luz solar, que es aprovechada por las plantas y las bacterias fotosintéticas. En la primera etapa de la fotosíntesis, la energía de la luz solar se emplea para promover la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la oxidación de $H_2O$ a $O_2$. El ATP y el NADPH producidos en estas reacciones son empleados entonces para sintetizar glucosa a partir de $CO_2$ y $H_2O$.

## BIOSÍNTESIS DE LOS COMPONENTES CELULARES

gluconeogénesis

***Carbohidratos***: La glucosa puede ser sintetizada a partir de otras moléculas orgánicas, empleando energía y poder reductor en forma de ATP y NADH, respectivamente. Entonces se necesita ATP adicional para promover la síntesis de polisacáridos a partir de azúcares simples.

***Lípidos***: Los lípidos son sintetizados a partir de acetil CoA, que se forma en la degradación de los carbohidratos.

fijación de nitrógeno

***Proteínas***: Los aminoácidos son sintetizados a partir de intermediarios de la glicolisis y del ciclo del ácido cítrico. Su polimerización para formar proteínas requiere energía adicional en forma de ATP y GTP.

***Ácidos nucleicos***: Los nucleótidos de purina y pirimidina son sintetizados a partir de carbohidratos y aminoácidos. Su polimerización a ADN y ARN es promovida por la utilización de nucleósidos trifosfatos como precursores activados.

## MEMBRANAS CELULARES

bicapa de fosfolípidos

***Lípidos de membrana***: La estructura básica de todas las membranas celulares es una bicapa de fosfolípidos. Las membranas de células animales también contienen glucolípidos y colesterol.

mosaico fluido, proteína integral de membrana, proteína periférica de membrana, proteína transmembrana, barril-$\beta$

***Proteínas de membrana***: Las proteínas pueden estar insertadas en la bicapa lipídica o bien asociadas a la membrana indirectamente, a través de interacciones proteína-proteína. Algunas proteínas atraviesan la bicapa lipídica; otras están ancladas a una vertiente de la membrana.

canal proteico, proteína transportadora, transporte pasivo, transporte activo

***Transporte a través de membranas celulares***: Las bicapas lipídicas son permeables sólo a moléculas pequeñas no cargadas. Los iones y la mayoría de las moléculas polares son transportados a través de las membranas celulares por proteínas de transporte específicas, cuya actuación puede ser acoplada a la hidrólisis o síntesis de ATP

## Preguntas

**1.** ¿Qué características del agua la hacen ideal como la molécula más abundante en las células?
**2.** Explica la diferencia entre un oligosacárido y un polisacárido.
**3.** ¿Cuál es la diferencia entre glucógeno y celulosa?
**4.** ¿En qué se diferencia un ácido graso de una grasa?
**5.** ¿Cuáles son las principales funciones de las grasas y los fosfolípidos en las células?
**6.** Además de servir como bloques de construcción para los ácidos nucleicos, ¿qué otras funciones importantes poseen los nucleótidos en las células?
**7.** Identifica diez aminoácidos apolares y describe dónde tienden a localizarse en una enzima soluble en agua típica.
**8.** El «bolsillo» de unión de la tripsina contiene un residuo de aspartato. ¿Cómo crees que afectaría a la actividad enzimática el cambiar este aminoácido por lisina?
**9.** Considera la reacción $A \rightleftharpoons B + C$, en la que $\Delta G°' = +3{,}5$ kcal/mol. Calcula $\Delta G$ en condiciones intracelulares, sabiendo que la concentración de A es $10^{-2}$ $M$ y las concentraciones de B y C son ambas de $10^{-3}$ $M$. ¿En qué dirección progresará la reacción en la célula? Para tus cálculos, $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado y $T$ = 298 K (25 C). Recuerda que ln ($x$) = 2,3 log 10 ($x$).
**10.** ¿Cuáles son las reacciones lumínicas y las reacciones oscuras de la fotosíntesis?
**11.** A pesar de que las proteínas transportadoras y los canales proteicos son muy similares, como la especificidad y saturación a concentraciones elevadas del soluto transportado, las proteínas transportadoras son más lentas que los canales proteicos. Explica.
**12.** ¿Por qué son las regiones que atraviesan la membrana de las proteínas transmembrana frecuentemente α-hélices?

## Bibliografía


### *Bibliografía general*

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman.
Mathews, C. K., K. E. van Holde and K. G. Ahern. 2000. *Biochemistry*. 3rd ed. Redwood City, CA: Benjamin Cummings.

### *Composición molecular de las células*

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230. [P]
Branden, C. and J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. New York: Garland.
Chothia, C. and A. V. Finkelstein. 1990. The classification and origins of protein folding patterns. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 1007-1039. [R]
Holm, L. and C. Sander. 1996. Mapping the protein universe. *Science* 273: 595-602. [R]
Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6): 96-111. [R]
Levitt, M., M. Gerstein, E. Huang, S. Subbiah and J. Tsai. 1997. Protein folding: The endgame. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 549-579. [R]
Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205-211. [P]
Richardson, J. S. 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34: 167-339. [R]
Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 1-28. [R]
Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200: 1012-1018. [R]

### *Papel central de las enzimas como catalizadores biológicos*

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9: 155-159. [R]
Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180: 149-154. [R]
Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 17-34. [R]
Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306-329. [P]
Narlikar, G. J. and D. Herschlag. 1997. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: Lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 19-59. [R]
Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350-357. [R]
Schramm, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 693-720. [R]

### *Energía metabólica*

Beinert, H., R. H. Holm and E. Munck. 1997. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-659. [R]
Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268-271. [R]
Calvin, M. 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135: 879-889. [R]
Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 1-23. [R]
Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154-170. [R]
Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621. [P]
Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*. 3rd ed. London: Academic Press.
Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493. [R]

### *Biosíntesis de los componentes celulares*

Hers, H. G. and L. Hue. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 617-653. [R]
Jones, M. E. 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 253-279. [R]
Kornberg, A. and T. A. Baker. 1991. *DNA Replication*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.
Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157. [R]
Umbarger, H. E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606. [R]
Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197. [R]
Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 537-579. [R]

### *Membranas celulares*

Bretscher, M. 1985. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253(4): 100-108. [R]
Dowham, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann. Rev. Biochem.* 66: 199-212. [R]
Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]
Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon.

2001. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501-39504. [R]

Petty, H. R. 1993. *Molecular Biology of Membranes: Structure and Function.* New York: Plenum Press.

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of $\beta$-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399-32402. [R]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69-99. [R]

White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe and K. Hristova. 2001. How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* 276: 32395-32398. [R]

Yeagle, P. L. 1993. *The Membranes of Cells.* 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

# 3 Fundamentos de biología molecular



LA BIOLOGÍA MOLECULAR CONTEMPORÁNEA se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética que en último término determinan la estructura y función celulares. Como fue expuesto en el Capítulo 1, todas las células comparten un número de propiedades básicas, y ésta unidad subyacente de la biología celular es particularmente evidente en el nivel molecular. Tal unidad ha permitido a los científicos elegir organismos sencillos (como las bacterias) como modelos para muchos experimentos fundamentales asumiendo que mecanismos moleculares similares son comunes en organismos tan distintos como *E. coli* y el organismo humano. Numerosos experimentos han demostrado la validez de esta premisa, y actualmente es evidente que la biología molecular celular proporciona un marco unificador para comprender diversos aspectos del comportamiento celular.

Los avances iniciales en biología molecular se lograron aprovechando el rápido crecimiento y la facilidad de manipulación del genoma de bacterias sencillas como *E. coli*, y sus virus. A continuación, el desarrollo del ADN recombinante permitió establecer tanto los principios fundamentales, como diversos procedimientos experimentales desarrollados en un principio en procariotas y aplicados posteriormente a células eucariotas. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha tenido un enorme impacto, inicialmente permitiendo el aislamiento y caracterización de genes eucarióticos individuales, y más recientemente permitiendo la determinación de secuencias completas del genoma de animales y plantas superiores, incluyendo el humano.

## Herencia, genes y ADN

Quizá la propiedad fundamental de todos los seres vivos es la capacidad de reproducirse. Todos los organismos heredan de sus progenitores la información genética especificando su estructura y función. De igual forma, todas las células provienen de otras células preexistentes, por lo que el material genético ha de ser replicado y transferido del progenitor a la célula hija en cada división celular. El modo por el cual la información genética es replicada y transmitida de célula a célula y de organismo a organismo representa pues una de las cuestiones centrales de la Biología. Así, la elucidación de los mecanismos de la transmisión genética y la identificación del ADN como el material genético fueron descubrimientos que constituyen los cimientos de nuestro entendimiento actual de la biología a nivel molecular.

### *Genes y cromosomas*

Los principios genéticos clásicos fueron deducidos por Gregor Mendel en 1865, basándose en experimentos con guisantes. Mendel estudió la herencia de un número de rasgos bien definidos, como el color de la semilla, y fue capaz de deducir las reglas generales para su transmisión. Interpretó correctamente los patrones de herencia observados asumiendo que cada rasgo está determinado por un par de factores heredados, conocidos actualmente como **genes**. De cada progenitor se hereda una copia del gen (llamada **alelo**) especificando cada rasgo. Por ejemplo cruzando dos variedades de guisantes —una con semillas amarillas y otra con semillas verdes— se obtienen los siguientes resultados (Fig. 3.1): Las cepas progenitoras tienen cada una dos copias idénticas del gen que especifica el color amarillo (*Y*) o verde (*y*) de las semillas, respectivamente. Las plantas hijas son por lo tanto híbridos, habiendo heredado un gen para semillas amarillas (*Y*) y otro para semillas verdes (*y*). Todas estas plantas hijas (la primera generación o $F_1$) tiene semillas amarillas, por lo que se dice que el amarillo (*Y*) es **dominante** y el verde (*y*) **recesivo**. El **genotipo** (composición genética) de los guisantes $F_1$ es entonces Yy, y su **fenotipo** (apariencia física) es amarillo. Si se cruza un descendiente $F_1$ con otro, dando lugar a la generación $F_2$, los genes de las semillas amarillas y verdes se segregan de tal forma que la proporción entre plantas $F_2$ con -semillas amarillas y aquellas con semillas verdes es 3:1.

Los descubrimientos de Mendel, aparentemente por delante de su tiempo, fueron ignorados hasta 1900, cuando las leyes de Mendel fueron redescubiertas y se reconoció su importancia. Poco después se propuso el papel de los **cromosomas** como portadores de genes, al evidenciar que la mayor parte de las células de plantas superiores y animales son **diploides**, es decir, contienen dos copias de cada cromosoma. Sin embargo, la formación de las células germinales (el espermatozoide y el óvulo) se produce a través de un tipo característico de división celular (**meiosis**) en el cual un único cromosoma de cada par se transmite a cada célula hija (Fig. 3.2). Por lo tanto, el espermatozoide y el óvulo son **haploides**, dado que contiene una copia de cada cromosoma. La unión de estas dos células haploides en la fertilización da lugar a un nuevo

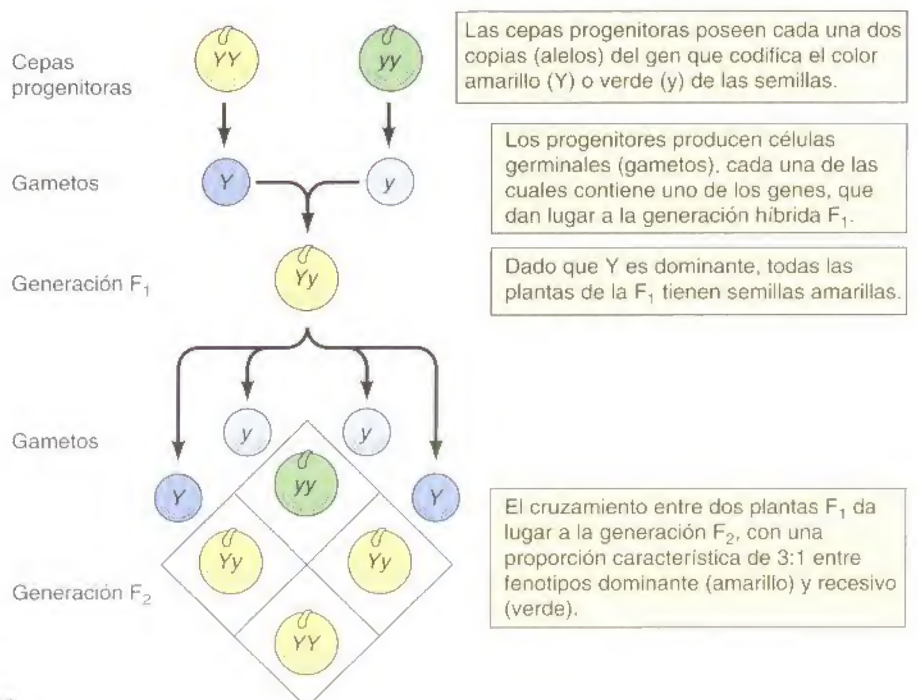



*Figura 3.1*
**Herencia de genes dominantes y recesivos.**

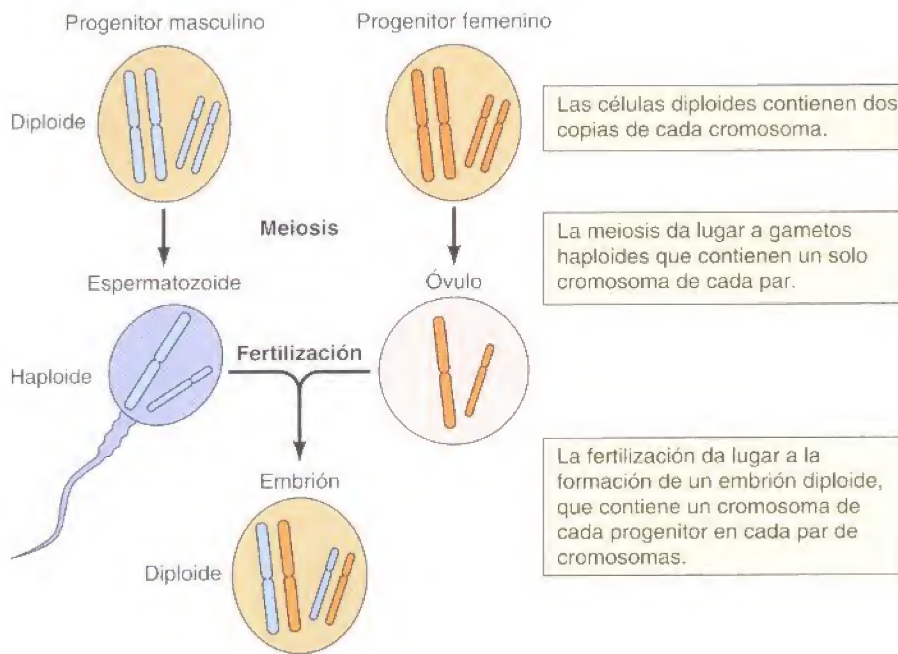



*Figura 3.2*
**Cromosomas durante la meiosis y fertilización.** Se ilustran dos pares de cromosomas de un organismo hipotético.

organismo diploide, que contiene ahora un cromosoma de cada par procedente de cada progenitor, masculino y femenino. El comportamiento de los pares de cromosomas se asemeja al de los genes, llevando a la conclusión de que los genes son transportados por los cromosomas.

Los fundamentos de las mutaciones, ligamiento genético y las relaciones entre genes y cromosomas fueron en su mayor parte establecidos en experimentos con la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster. Drosophila* se mantiene con facilidad en el laboratorio, y se reproduce cada dos semanas, lo cual es una considerable ventaja para experimentos genéticos. De hecho, estas características siguen haciendo a *Drosophila* un organismo de elección para estudios genéticos en animales, particularmente en el análisis genético del desarrollo y la diferenciación.

A principios de este siglo se identificaron una serie de alteraciones genéticas (**mutaciones**) en *Drosophila*, afectando a características fácilmente observables como el color de los ojos o la forma de las alas. Los experimentos de cruzamiento indicaron que algunos de los genes responsables de estos rasgos se heredan de forma independiente entre ellos, sugiriendo que estos genes se localizan en diferentes cromosomas que se segregan independientemente durante la meiosis (Fig. 3.3). Otros genes, por otro lado, se heredan juntos como características emparejadas. Dichos genes se dice que están ligados entre sí en virtud de estar localizados en el mismo cromosoma. El número de grupos de genes ligados es el mismo que el número de cromosomas (cuatro en *Drosophila*), apoyando la idea de que los cromosomas son los portadores de los genes. En 1915, se habían definido y mapeado casi cien genes en cuatro cromosomas de *Drosophila*, dando lugar a una aceptación general de la base cromosómica de la herencia.

## *Genes y enzimas*

Los estudios genéticos iniciales se centraron en la identificación y localización cromosómica de los genes que controlan características fácilmente observables, como el color de los ojos de *Drosophila*. Sin embargo, el modo por el que los genes producían los fenotipos observados era desconocido. La primera observación de la relación entre genes y enzimas llegó en 1909, cuando se evi-

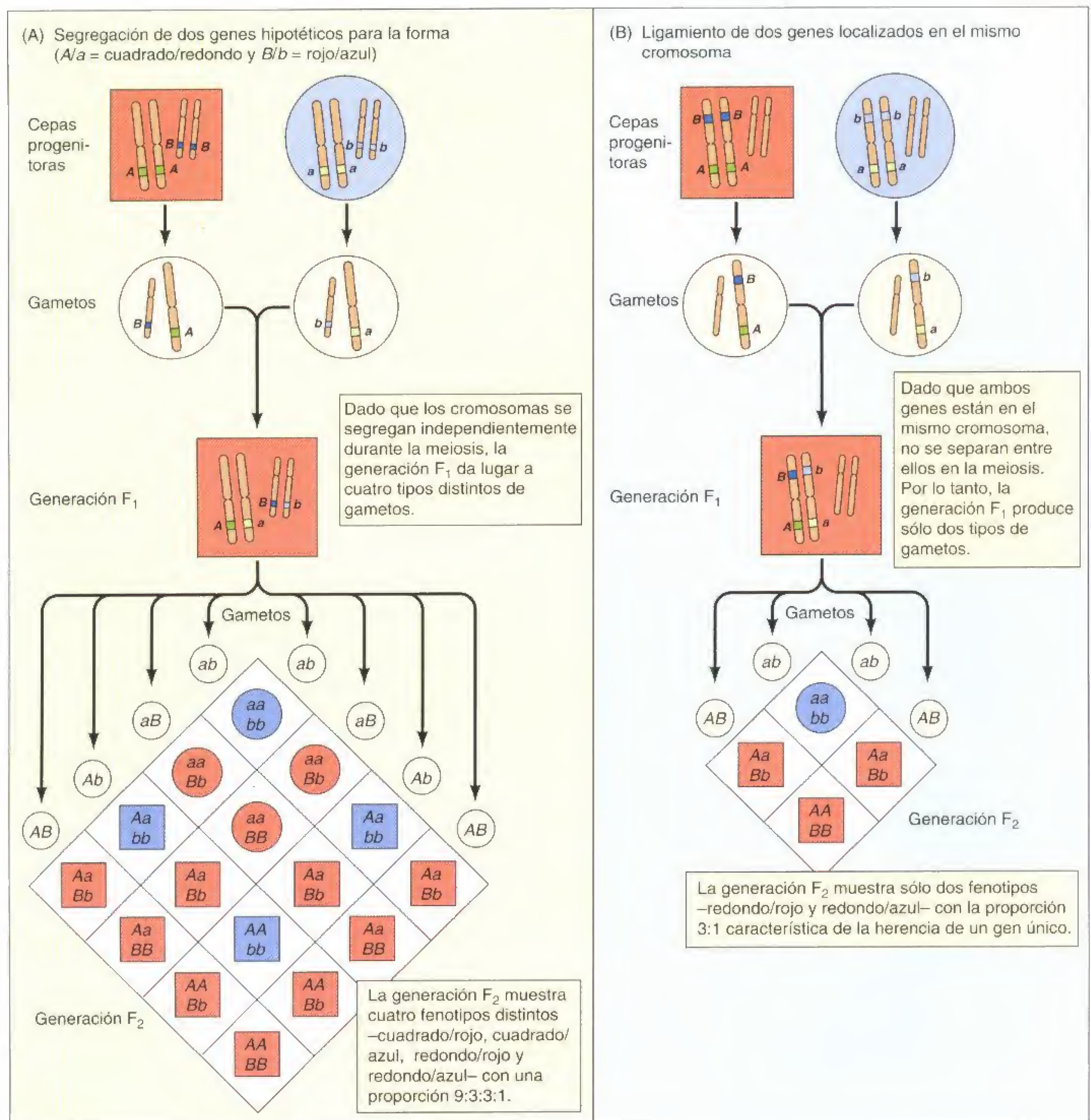



*Figura 3.3*
**Segregación y ligamiento genético.** (A) Segregación de dos genes hipotéticos para la forma (*A/a* = cuadrado/redondo) y el color (*B/b* = rojo/azul) localizados en distintos cromosomas. (B) Ligamiento de dos genes localizados en el mismo cromosoma.

denció que la enfermedad hereditaria humana fenilcetonuria (véase Medicina Molecular, Cap. 2) resultaba de un defecto genético en el metabolismo del aminoácido fenilalanina. Surgió la hipótesis de que el defecto aparecía por una deficiencia de la enzima necesaria para catalizar alguna reacción metabólica implicada en el metabolismo aminoácido, llevando a la presunción general de que los genes especifican la síntesis de enzimas.

Una evidencia más clara de la relación entre los genes y la síntesis de enzimas llegó con los experimentos de George Beadle y Edward Tatum, llevados a cabo en 1941 con el hongo *Neurospora crassa*. En el laboratorio *Neurospora*

puede cultivarse en medios de cultivo básicos o enriquecidos similares a los descritos en el Capítulo 1 para el cultivo de *E.coli*. Para *Neurospora* los medios básicos contienen únicamenste sal, glucosa y biotina; los enriquecidos se suplementan con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Beadle y Tatum aislaron cepas mutantes de *Neurospora* que crecían con normalidad en medios enriquecidos pero no crecían en medios básicos. Se encontró que cada mutante requería un suplemento nutricional específico, como un determinado aminoácido, para poder crecer. Además se correlacionaba la necesidad de un determinado nutriente con la incapacidad de la cepa mutante para sintetizarlo. De este modo, cada mutación producía una deficiencia en una vía metabólica específica. Dado que se sabía que estas rutas metabólicas estaban compuestas de enzimas, la conclusión de estos experimentos fue que cada gen codificaba la síntesis de una enzima única —**la hipótesis un gen-una enzima**. Actualmente se sabe que muchas enzimas se componen de varios polipéptidos, por lo que la afirmación aceptada en este momento es que cada gen codifica la estructura de una cadena polipeptídica.

## *Identificación del ADN como el material genético*

El entendimiento de la base cromosómica de la herencia y la relación entre genes y enzimas no aportaron *per se* una explicación molecular del gen. Los cromosomas contienen proteínas además de ADN, y se creyó inicialmente que los genes eran proteínas. La primera evidencia que llevó a la identificación del ADN como el material genético llegó de estudios en bacterias. Estos experimentos representan el prototipo de los abordajes actuales para definir la función de los genes basados en la introducción de secuencias de ADN en las células, como será expuesto más adelante en este capítulo.

Los experimentos que definieron el papel del ADN se derivaron de estudios sobre la bacteria que causa la neumonía (*Pneumococcus*). Las cepas virulentas de *Pneumococcus* están rodeadas de una cápsula de polisacárido que protege a la bacteria del ataque del sistema inmune del huésped. Dado que la cápsula da a las colonias un aspecto liso en el medio de cultivo, las cepas encapsuladas se denominan L. Las cepas mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar la cápsula (denominadas R) forman colonias con el borde rugoso y no son letales cuando se inoculan en el ratón. En 1928 se observó que los ratones inoculados con bacterias no encapsuladas ( R) y bacterias encapsuladas (S) inactivadas con calor desarrollaron neumonía y murieron. Conviene reseñar que las bacterias aisladas en estos ratones eran del tipo S. Experimentos posteriores mostraron que un extracto de bacterias de tipo S libre de células era igualmente capaz de convertir (o transformar) bacterias R al estado S. Por lo tanto, una sustancia en el extracto S (llamado el principio transformador o transformante) era responsable de inducir la **transformación** genética de bacteria R a S.

En 1944 Oswald Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarty establecieron de forma doble que el principio transformador era ADN, purificándolo de extractos bacterianos y demostrando que su actividad desaparece tras la digestión enzimática del ADN y no tras la digestión enzimática de las proteínas (Fig. 3.4). Pese a que estos estudios no llevaron a la aceptación inmediata del ADN como el material genético, fueron ampliados unos pocos años después con experimentos con virus bacterianos. En particular se observó que cuando un virus infectaba a una célula era preciso que el ADN viral penetrara en la célula (pero no las proteínas) para que el virus se replicara. Además, a las partículas virales hijas se transmite el ADN del virus progenitor y no sus proteínas. La concurrencia de estos resultados junto con estudios posteriores de la actividad del ADN en la transformación bacteriana llevó a la aceptación de la idea de que el ADN es el material genético.

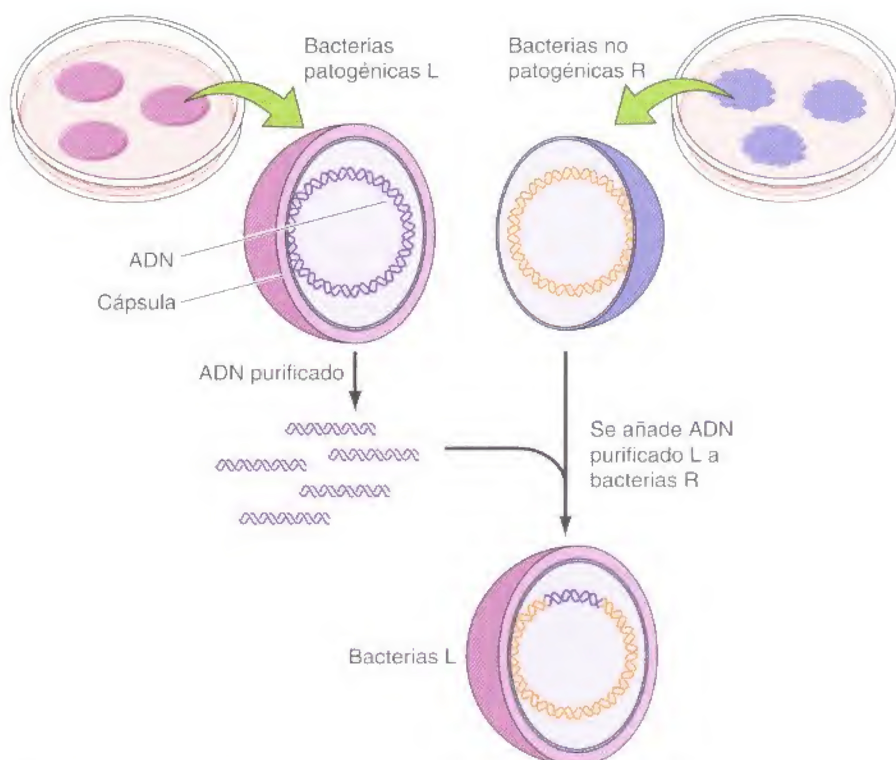



*Figura 3.4*
**Transferencia de información genética por el ADN.** Se extrae el ADN de una cepa patogénica de *Pneumococcus*, rodeado de una cápsula y que forma colonias lisas (L). Si se añade este ADN purificado L a un cultivo de *Pneumococcus* no patogénicos, que no forman cápsula y que forman colonias rugosas (R), se transforman a la forma L. Por lo tanto el ADN purificado contiene la información genética responsable de la transformación de bacterias R en L.

## *Estructura del ADN*

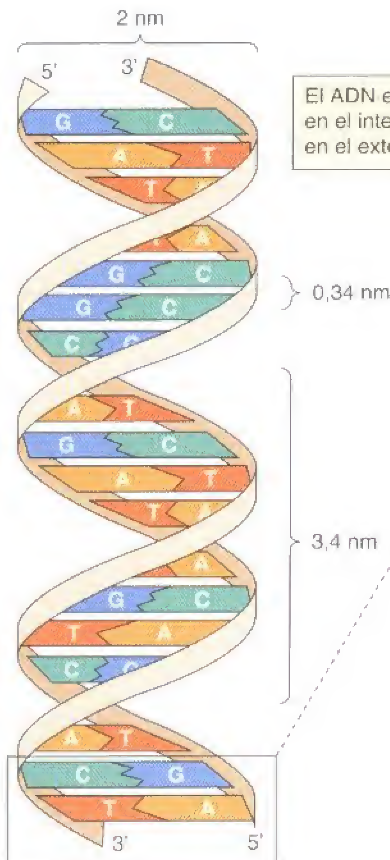
La comprensión de la estructura tridimensional del ADN, deducida en 1953 por James Watson y Francis Crick, ha sido la base para la biología molecular actual. En la época de los trabajos de Watson y Crick se sabía que el ADN era un polímero compuesto de cuatro nucleótidos —dos purinas (adenina [A] y guanina [G]) y dos pirimidinas (citosina [C] y timina [T])— unidas a azúcares fosforilados. Dado el papel central del ADN como material genético, la elucidación de su estructura tridimensional parecía crítica para entender su función. El enfoque de Watson y Crick del problema estuvo muy influenciado por la descripción de Linus Pauling de las uniones por puentes de hidrógeno y la $\alpha$-hélice, un tipo común de estructura secundaria de las proteínas (véase el Cap. 2). Se obtuvo además información experimental sobre la estructura del ADN con los estudios de cristalografía por refracción de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin. El análisis de estos datos reveló que el ADN es una hélice que da un giro cada 3,4 nm, y que la distancia entre bases es de 0,34 nm, por lo que en cada vuelta de la hélice hay diez bases. Un dato importante es que el diámetro de la hélice es de 2 nm, sugiriendo que está compuesto no de una sino de dos cadenas de ADN.

A partir de estos datos Watson y Crick construyeron su modelo del ADN (Fig. 3.5). La principal característica es que se trata de una doble hélice con el esqueleto azúcar-fosfato en el exterior de la molécula. Las bases están en el interior, orientadas de tal forma que se forman enlaces de hidrógeno entre puri-

nas y pirimidinas de cadenas opuestas. El apareamiento de las bases es muy específico: A siempre se empareja con T y G con C. Esta especificidad explica los resultados previos de Erwin Chargaff, quien analizó la composición de diversos ADN y encontró que la cantidad de adenina era siempre equivalente a la de timina, y la cantidad de citosina a la de guanina. A causa de esta especificidad en el apareamiento de bases las dos hebras de ADN son complementarias: cada hebra contiene toda la información necesaria para especificar la secuencia de bases de la otra.

## *Replicación del ADN*

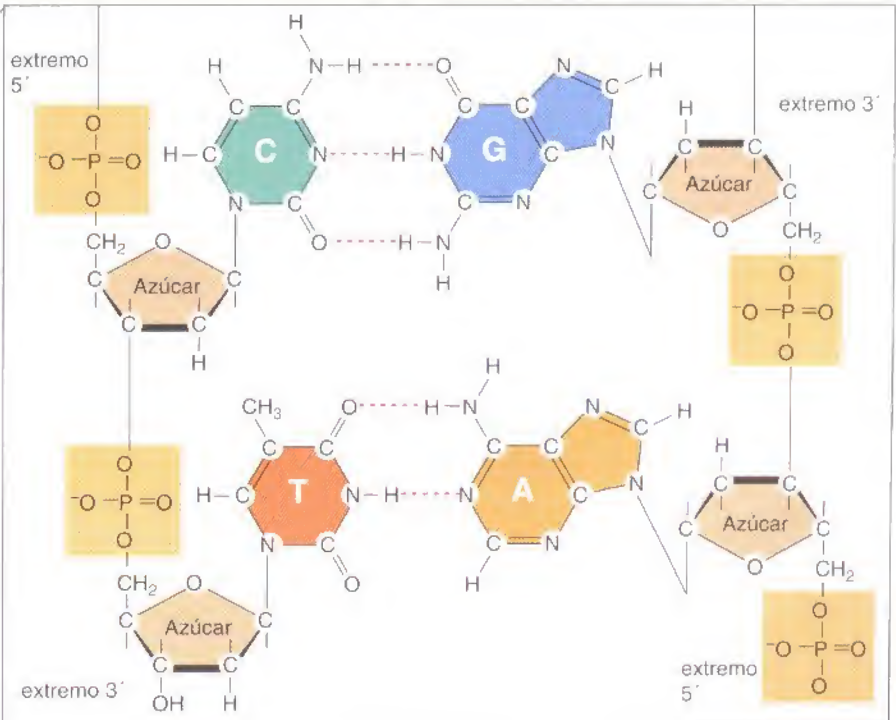
El descubrimiento de la especificidad en el apareamiento de las bases entre las dos hebras del ADN sugirió de forma inmediata una solución para la cuestión de cómo el material genético dirige su propia replicación —un proceso que es necesario cada vez que la célula se divide. Se propuso que las dos hebras de la molécula de ADN se podrían separar y servir como moldes para la síntesis de nuevas hebras complementarias, cuya secuencia sería dictada por la especifici-




El ADN es una doble hélice con las bases en el interior y el esqueleto azúcar fosfato en el exterior de la molécula.

*Figura 3.5*
**Estructura del ADN.**

Las bases de la hebras opuestas se aparean mediante enlaces de hidrógeno entre adenina (A) y timina (T), y entre guanina (G) y citosina (C). Las dos hebras de ADN corren en direcciones opuestas, definidas por los grupos 5´ y 3´ de las unidades de desoxirribosas.



dad en el apareamiento de bases (Fig. 3.6). El proceso se denomina **replicación semiconservativa** porque una hebra de ADN progenitor se conserva en cada una de las dos moléculas hijas de ADN.

En 1958 se obtuvo apoyo directo para la teoría de la replicación semiconservativa del ADN gracias a una serie de elegantes experimentos llevados a cabo por Matthew Meselson y Frank Stahl, en los cuales el ADN fue marcado con isótopos que alteraron su densidad (Fig. 3.7). Se hizo crecer *E. coli* en medios de cultivo que contenían el isótopo pesado del nitrógeno ($N^{15}$) en lugar del isótopo normal, más ligero ($N^{14}$). Consecuentemente el ADN de estas bacterias contenía $N^{15}$ y era más pesado que el de las bacterias crecidas en $N^{14}$. Este ADN pesado se podía separar del ADN que contenía $N^{14}$ por centrifugación de equilibrio en un gradiente de densidad de CsCl. Esta posibilidad de separar ADN pesado ($N^{15}$) de ADN ligero ($N^{14}$) permitió estudiar la síntesis de ADN. Se transfirieron células de *E. coli* que habían crecido en el medio con $N^{15}$ a un medio que contenía $N^{14}$, y se les permitió replicarse una vez más. Se extrajo su ADN y se analizó por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl. Los resultados de este análisis indicaron que todo el ADN pesado había sido reemplazado por ADN de nueva síntesis con una densidad intermedia entre el de las moléculas de ADN pesada ($N^{15}$) y ligera ($N^{14}$). El significado es que durante la replicación las dos hebras de ADN parental pesado se separan y sirven de moldes para la síntesis de hebras hijas de ADN ligero, produciendo moléculas de doble hebra de densidad intermedia. Este experimento proporcionó evidencia directa de la replicación semiconservativa del ADN, subrayando la importancia del apareamiento complementario de bases entre las hebras de la doble hélice.

La capacidad del ADN para servir de molde para su propia replicación fue establecida más adelante con la demostración de que una enzima purificada de *E. coli* (la **ADN polimerasa**) podía catalizar la replicación del ADN *in vitro*. Con la presencia de ADN como molde, la ADN polimerasa era capaz de dirigir la incorporación de nucleótidos en una molécula del ADN complementaria.

## Expresión de la información genética

Los genes actúan determinando la estructura de las proteínas, que son responsables de dirigir el metabolismo celular a través de su función como enzimas. La identificación del ADN como el material genético y la elucidación de su estructura revelaron que la información genética se especifica por el orden de las cuatro

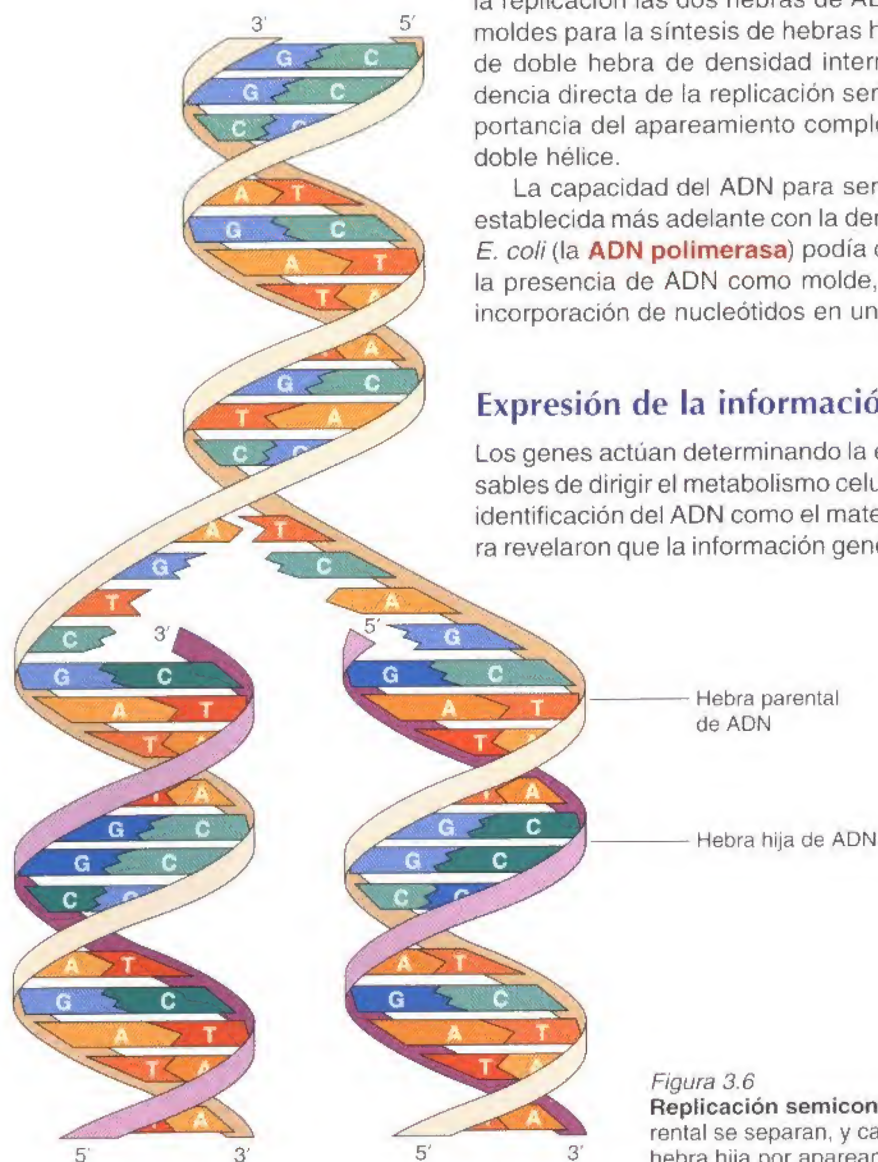



*Figura 3.6*
**Replicación semiconservativa del ADN.** Las dos hebras de ADN parental se separan, y cada una sirve como molde para la síntesis de una hebra hija por apareamiento complementario de bases.

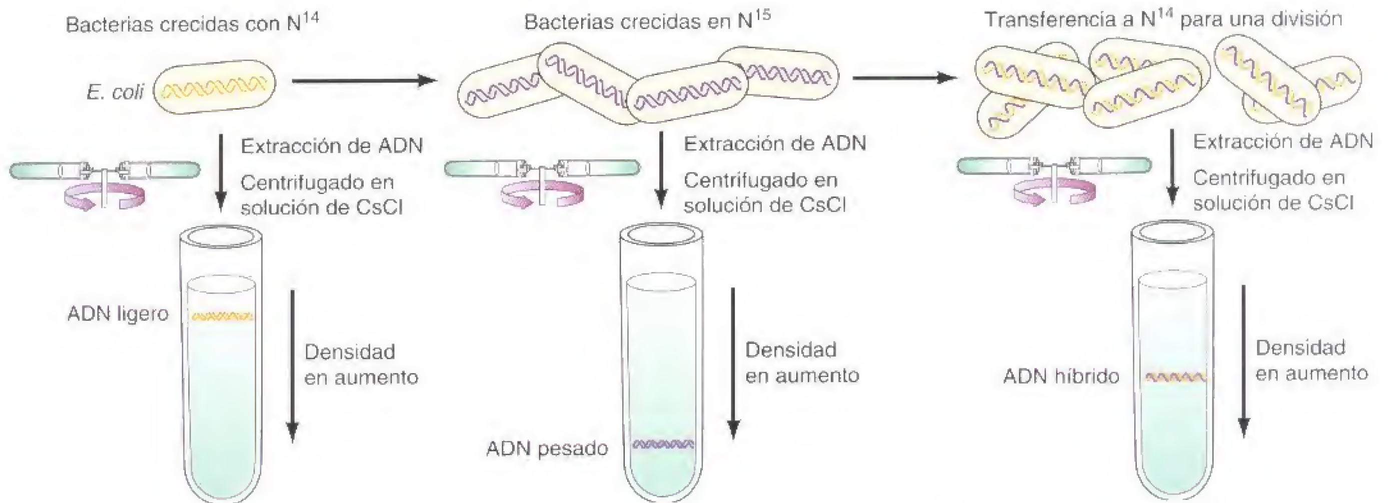



*Figura 3.7*
**Demostración experimental de la replicación semiconservativa.** Se transfieren bacterias que han sido cultivadas en un medio con el isótopo normal del nitrógeno ($N^{14}$) a un medio que contiene un isótopo pesado ($N^{15}$) y se dejan crecer durante varias generaciones. Se transfieren de nuevo a un medio que sólo contiene $N^{14}$ y se dejan crecer durante una generación adicional. Se extrae su ADN y se analiza por centrifugación de equilibrio con una solución del CsCl, el cual sedimenta formando un gradiente de densidad. Las moléculas de ADN se depositan a una altura a la que su densidad es equivalente a la del CsCl. El ADN de la bacteria crecida en $N^{15}$ que fue transferida para un único ciclo en $N^{14}$ se deposita a una altura intermedia entre las del ADN de bacterias cultivadas exclusivamente en $N^{14}$ y $N^{15}$. Esto significa que es una molécula híbrida con una hebra ligera y otra pesada.

bases (A, C, G y T) que constituyen la molécula de ADN. Las proteínas son polímeros de 20 aminoácidos, cuya secuencia determina su estructura y función. La primera relación directa entre una mutación genética y una alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína se estableció en 1957, cuando se descubrió que los pacientes con una enfermedad hereditaria denominada anemia de células falciformes poseen moléculas de hemoglobina que difieren de las normales en una sola sustitución de un aminoácido. Se obtuvo un entendimiento más profundo de la relación molecular entre ADN y proteínas tras una serie de experimentos que tomaron como modelos genéticos a *E. coli* y sus virus.

### *Colinealidad de genes y proteínas*

La hipótesis más simple para entender la relación entre genes y enzimas era que el orden de los nucleótidos en el ADN especificaba el orden de aminoácidos en la proteína. Las mutaciones en un gen se corresponderían con alteraciones en la secuencia de ADN, que resultarían de la sustitución de un nucleótido por otro o de la adición o delección de nucleótidos. Estos cambios en la secuencia de nucleótidos producirían los cambios correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen en cuestión. Esta hipótesis predecía que distintas mutaciones en el mismo gen alterarían distintos aminoácidos en la proteína codificada, y que las posiciones de las mutaciones en un gen se reflejarían en las posiciones de las alteraciones en los aminoácidos a lo largo de su producto proteínico.

La rapidez de replicación y la simplicidad del sistema genético de *E. coli* fueron de gran ayuda para abordar estas cuestiones. Se pueden aislar una gran variedad de mutantes, incluidas mutaciones nutricionales que (de igual modo que las mutaciones de *Neurospora* discutidas previamente) requieren determinados aminoácidos para crecer. El rápido crecimiento de *E. coli* hizo posible el aislamiento y mapeo de mutaciones múltiples en el mismo gen, llevando a la primera demostración de la relación lineal entre genes y proteínas. En estos estudios Charles Yanofsky y sus colaboradores mapeados una serie de mutaciones en el gen que codifica una enzima necesaria para la síntesis del aminoácido triptófano. El análisis de las enzimas codificadas por los genes mutantes reveló que las posiciones relativas de los aminoácidos alterados eran las mismas que las de las mutaciones correspondientes (Fig. 3.8). Por lo tanto la secuencia de aminoácidos en la proteína es colineal con la de mutaciones en el gen, como es de esperar si el orden de nucleótidos en el ADN especifica el orden de aminoácidos en la proteína.

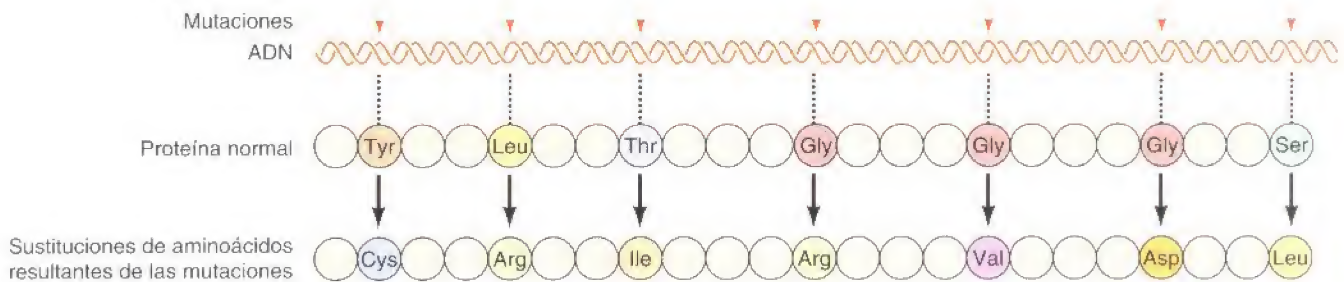



*Figura 3.8*
**Colinealidad de genes y proteínas.** Una serie de mutaciones (puntas de flecha) fueron mapeadas en el gen de *E. coli* que codifica la triptófano sintetasa (línea superior). Las sustituciones de aminoácidos resultantes de cada mutación fueron determinadas por secuenciación de las proteínas de la bacteria mutante (línea inferior). Estos análisis revelaron que el orden de las mutaciones en el ADN era el mismo que el orden de las sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada.

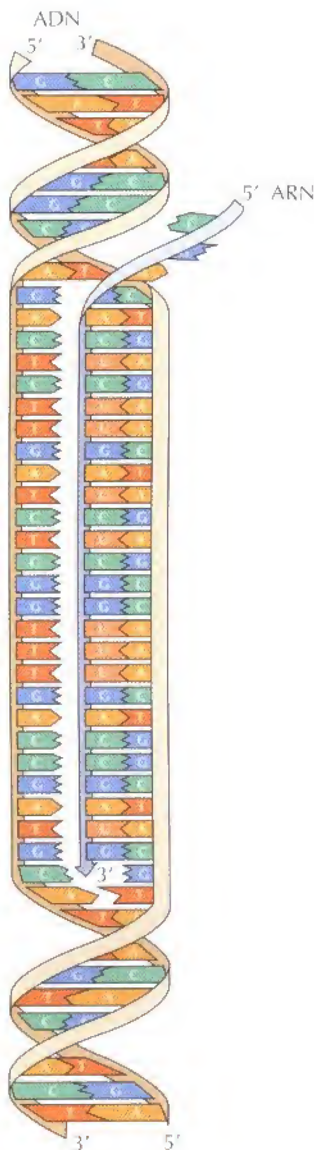



*Figura 3.9*
**Síntesis de ARN a partir de ADN.** Las dos hebras de ADN se desenrollan, y una es usada como molde para la síntesis de una hebra de ARN.

## *Papel del ARN mensajero*

Aunque la secuencia de nucleótidos en el ADN parecía especificar el orden de los aminoácidos en las proteínas, eso no significaba necesariamente que el ADN dirigiera por sí mismo la síntesis de proteínas. De hecho, no parecía ser el caso, dado que el ADN se localiza en el núcleo de las células eucarióticas, mientras que la síntesis proteínica se lleva a cabo en el citoplasma. Era necesaria otra molécula para llevar la información genética del ADN a los sitios donde se realiza la síntesis de proteínas (los ribosomas).

El ARN se antojaba un buen candidato para ser dicho intermediario porque la similitud de su estructura con la del ADN sugería que el ARN podía ser sintetizado a partir de un molde de ADN (Fig. 3.9). El ARN difiere del ADN en que se compone de una cadena única en vez de ser de doble cadena, sus azúcares son ribosas en vez de desoxirribosas y contiene la base pirimidínica uracilo (U) en vez de timina (T) (véase la Fig. 2.10). Sin embargo, ni el cambio de azúcar ni la sustitución de T por U altera el apareamiento de las bases, por lo que la síntesis de ARN puede ser realizada de manera directa sobre un molde de ADN. Además, dado que el ARN se localiza primariamente en el citoplasma, parecía un intermediario lógico para transferir la información del ADN a los ribosomas. Estas características del ARN sugirieron una vía para el flujo de información genética que se conoce como el **dogma central** de la biología molecular:


ADN ⟶ ARN ⟶ Proteína

De acuerdo con este concepto, las moléculas de ARN se sintetizan a partir de moldes de ADN (un proceso llamado **transcripción**), y las proteínas se sintetizan a partir de moldes de ARN (un proceso denominado **traducción**).

La evidencia experimental sobre la intermediación del ARN postulada por el dogma central fue obtenida por Sidney Brenner, Francois Jacob y Matthew Meselson en estudios de *E. coli* infectados por el bacteriófago T4. La síntesis de ARN de *E. coli* se interrumpe tras la infección por el bacteriófago T4, después de lo cual el único ARN de nueva síntesis en bacterias infectadas es transcrito a partir del ADN del T4. Este ARN del T4 se une a ribosomas bacterianos, transfiriendo la información del ADN al lugar donde se realiza la síntesis proteínica. Debido a su función como intermediarios en el flujo de información genética, las moléculas de ARN que sirven de moldes para la síntesis proteínica se denominan **ARNs mensajeros** (**ARNm**). Son transcritos por una enzima (**ARN polimerasa**) que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN.

Aparte del ARNm, existen otros dos tipos de moléculas de ARN que son importantes en la síntesis proteínica. El **ARN ribosómico** (**ARNr**) es un compo-

nente de los ribosomas, y el **ARN de transferencia** (**ARNt**) funciona como una molécula adaptadora que alinea los aminoácidos a lo largo del molde de ARNm. La estructura y función de estas moléculas se tratan en la siguiente sección y en mayor detalle en los Capítulos 6 y 7.

### *Código genético*

¿Cómo se traduce la secuencia de nucleótidos del ARNm a la secuencia de aminoácidos de una proteína? En este escalón de la expresión génica se transfiere información genética entre macromoléculas químicamente no relacionadas —ácidos nucleicos y proteínas— y plantea dos nuevos problemas para entender la acción de los genes.

Primero, dado que los aminoácidos no se relacionan estructuralmente con las bases de los ácidos nucleicos, el apareamiento complementario directo entre las bases del ARNm y los aminoácidos durante la incorporación de éstos a las proteínas parecía imposible. ¿Cómo se alineaban entonces los aminoácidos sobre el molde de ARN durante la síntesis proteínica? Esta cuestión se aclaró con el descubrimiento de que los ARNt sirven de adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la traducción (Fig. 3.10). Previamente a su utilización en la síntesis proteínica, cada aminoácido se une a su ARNt por medio de una enzima específica. El apareamiento de bases entre una secuencia de reconocimiento del ARNt y una secuencia complementaria en el ARNm dirige al aminoácido a su posición correcta en el molde de ARNm.

El segundo problema para traducir una secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos era la determinación del **código genético**. ¿Cómo se podría transferir la información contenida en una secuencia nucleotídica de cuatro elementos a la secuencia de 20 aminoácidos distintos que compone las proteínas? Dado que cuatro nucleótidos deben codificar 20 aminoácidos, son precisos al menos tres nucleótidos para codificar cada aminoácido. Tomados individualmente, los cuatro nucleótidos sólo pueden codificar cuatro aminoácidos, y tomados en parejas cuatro nucleótidos sólo codifican dieciséis ($4^2$) aminoácidos. Sin embargo, tomados de tres en tres cuatro nucleótidos podrían codificar 64 ($4^3$) aminoácidos distintos —más que suficiente para los 20 aminoácidos existentes en las proteínas.

La evidencia experimental directa se obtuvo en estudios con el bacteriófago T4, portador de mutaciones en un gen conocido detalladamente, llamado *rII*. Los fagos con mutaciones en este gen forman placas anormalmente grandes, que son fácilmente distinguibles de las formadas por fagos del tipo salvaje. Por lo tanto, fue sencillo aislar y mapear un cierto número de estas mutaciones en el *rII*, lo cual llevó al establecimiento de un detallado mapa genético de este *locus*. El estudio de las recombinaciones entre mutantes del gen *rII* que surgieron por adiciones o deleciones de nucleótidos reveló que los fagos que contenían adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos siempre mostraban el fenotipo mutante. Sin embargo, los fagos que contenían adiciones o deleciones de tres nucleótidos eran funcionalmente del tipo salvaje (Fig. 3.11). Estos hallazgos sugirieron que el gen se lee en grupos de tres nucleótidos, empezando a partir de un punto fijo. Adiciones o deleciones de uno o dos nucleótidos alterarían el marco de lectura de todo el gen, llevando a la codificación de aminoácidos anormales a lo largo de toda la proteína. Por el contrario, la adición o deleción de tres nucleótidos lleva a la adición o deleción de un solo aminoácido; el resto de

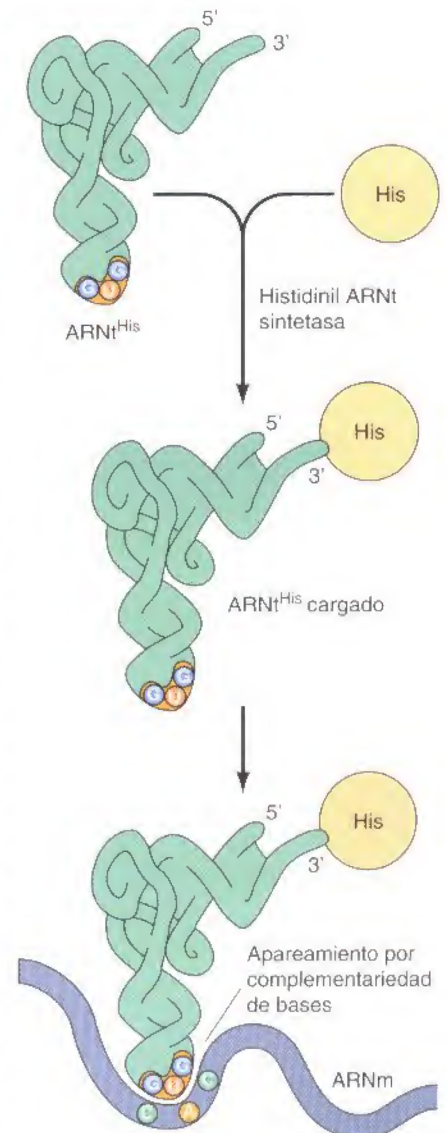



*Figura 3.10*
**Función del ARN de transferencia.** El ARN de transferencia sirve como un adaptador durante la síntesis proteica. Cada aminoácido (p. ej., histidina) se une al extremo 3' de un RNAt por una enzima apropiada (una aminoacil RNAt sintetasa). El RNAt cargado se alinea sobre un molde de RNAm por complementariedad de bases.

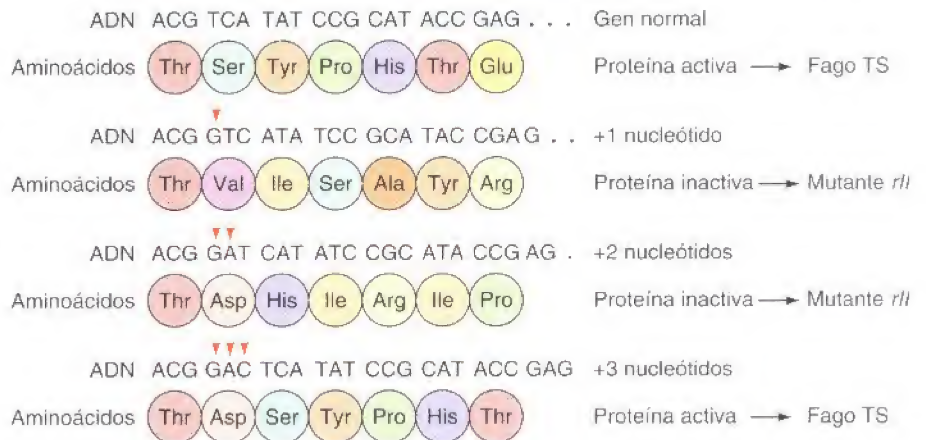


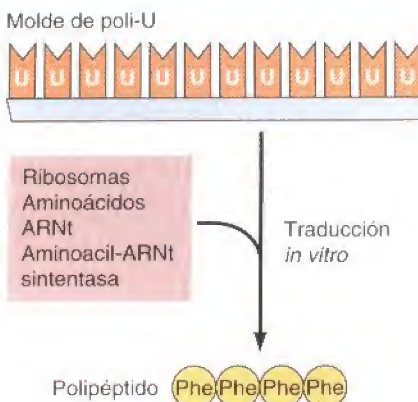

*Figura 3.11*
**Evidencia genética del código de tripletes.** Fueron estudiadas una serie de mutaciones que consistían en la adición de uno, dos o tres nucleótidos en el gen *rII* del bacteriófago T4. La adición de uno ó dos nucleótidos altera el marco de lectura de todo el resto del gen. Por lo tanto todos los aminoácidos son anormales y se produce una proteína inactiva, dando lugar a un fago mutante. La adición de tres nucleótidos, por el contrario, altera un único aminoácido. El marco de lectura del resto del gen es normal, y se produce una proteína activa que da lugar al fago de tipo salvaje (TS).

la secuencia aminoacídica permanece inalterada, produciendo frecuentemente una proteína activa.

El desciframiento del código genético se convirtió en un problema de asignar tripletes de nucleótidos a sus correspondientes aminoácidos. La aproximación al problema consistió en el uso de sistemas *in vitro* que realizaran síntesis proteínica (**traducción *in vitro***). Se sabía que los extractos celulares que contienen ribosomas, aminoácidos, ARNt y las enzimas responsables de unir a los aminoácidos con su correspondiente ARNt (aminoacil-ARNt sintetasas) son capaces de catalizar la incorporación de aminoácidos a las proteínas. Esta síntesis proteínica depende de la presencia de ARNm unido a los ribosomas, y se puede aumentar añadiendo ARNm purificado. Dado que el ARNm dirige la síntesis proteínica en estos sistemas, el código genético podría ser descodificado estudiando la traducción de ARNm sintético de secuencia conocida.

El primero de dichos experimentos, llevado a cabo por Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei, consistió en la traducción *in vitro* de un polímero de ARNm que únicamente contenía uracilo (Fig. 3.12). Este molde de poli-U dirigió la incorporación de un único aminoácido —fenilalanina— en un polipéptido formado por residuos repetidos de fenilalanina. Por lo tanto el triplete UUU codifica el aminoácido fenilalanina. Experimentos similares con polímeros de ARNm compuestos de un único nucleótido establecieron que AAA codifica la lisina y CCC codifica la prolina. El resto del código fue descifrado utilizando polímeros de ARNm compuestos de mezclas de nucleótidos, llevando a la asignación de los 64 posibles tripletes (denominados **codones**) (Tabla 3.1). De los 64 codones, 61 codifican algún aminoácido; los tres restantes (UAA, UAG y UGA) son codones de parada o *stop* que señalizan la terminación de la síntesis proteínica. El código está degenerado, dado que muchos aminoácidos están codificados por más de un codón. Con pocas excepciones (discutidas en el Cap. 10), todos los organismos utilizan el mismo código genético, apoyando con fuerza la conclusión de que todas las células actuales han evolucionado a partir de un ancestro común.

*Figura 3.12*
**El triplete UUU codifica a la fenilalnina.** La traducción *in vitro* de un ARN sintético compuesto de uracilos repetidos (un molde de uracilos repetidos (un molde de poli-U) lleva a la síntesis de un polipéptido compuesto únicamente por fenilalanina.




## *Virus ARN y transcripción inversa*

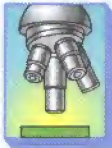
Con el esclarecimiento del código genético, los principios fundamentales de la biología molecular celular parecían estar establecidos. De acuerdo con el dogma central, el material genético es el ADN, que es capaz de autorreplicarse además de transcribirse a ARNm, que sirve a su vez de molde para la síntesis proteínica. Sin embargo, como fue expuesto en el Capítulo 1, muchos virus contienen ARN en vez de ADN como material genético, lo cual implica la existencia de otros modos de transferencia de información.

**TABLA 3.1.** El código genético

| Primera posición | Segunda posición U | C | A | G | Tercera posición |
|---|---|---|---|---|---|
| U | Phe | Ser | Tyr | Cys | U |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | STOP | STOP | A |
| | Leu | Ser | STOP | Trp | G |
| C | Leu | Pro | His | Arg | U |
| | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | A |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ile | Thr | Asn | Ser | U |
| | Ile | Thr | Asn | Ser | C |
| | Ile | Thr | Lys | Arg | A |
| | Met | Thr | Lys | Arg | G |
| G | Val | Ala | Asp | Gly | U |
| | Val | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | A |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

Los genomas de ARN fueron descubiertos en primer lugar en virus vegetales, muchos de los cuales se componen únicamente de ARN y proteínas. En los años 50 se obtuvo evidencia directa de que el ARN actúa como material genético por medio de experimentos que demostraron que el ARN purificado del virus del mosaico del tabaco podía infectar nuevas células, dando lugar a una progenie de virus infectivos. El modo de replicación de la mayoría de los genomas virales ARN se determinó posteriormente en estudios de los bacteriófagos ARN de *E. coli*. Estos virus codifican una enzima específica que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ARN (síntesis de ARN dirigida por ARN), utilizando el mismo mecanismo de apareamiento de bases entre hebras complementarias que se da durante la replicación del ADN o durante la transcripción de ARN a partir de ADN.

Aunque la mayoría de los virus animales, como el poliovirus o el virus influenza, se observó que se replicaban por síntesis de ARN dirigida por ARN, este mecanismo no parecía explicar la replicación de una familia de virus animales (los virus ARN tumorigénicos), que eran de especial interés debido a su capacidad de causar cáncer en animales infectados. Pese a que estos virus contienen ARN genómico en las partículas virales, los experimentos llevados a cabo por Howard Temin en los 60 indicaron que se requería síntesis de ADN en las células infectadas para completar su ciclo vital, llevando a la hipótesis de que los virus tumorales de ARN (denominados actualmente **retrovirus**) se replicaban por medio de la síntesis de un ADN intermediario, llamado provirus de ADN (Fig. 3.13). Esta hipótesis fue recibida inicialmente con incredulidad generalizada dado que implica la síntesis de ADN dirigida por ARN —una inversión del dogma central de la biología molecular—. Sin embargo, en 1970 Howard Temin y David Baltimore descubrieron de forma independiente que el ARN de los virus tumorales contenía una enzima que cataliza la síntesis de ADN desde un molde de ARN. Adicionalmente se obtuvo evidencia fehaciente de la existencia de secuencias de ADN viral en las células infectadas. La síntesis de ADN a partir de ARN, ahora denominada **transcripción inversa**, fue establecida como un nuevo modo de transferencia de información en sistemas biológicos.



## Experimento clave

# *Hipótesis del provirus de ADN*

**Naturaleza del provirus del sarcoma de Rous**
Howard M. Temin

Laboratorio McArdle, Universidad de Wisconsin, Madison, WI

*Monográficos del National Cancer Institute. Volumen 17, 1964, págs. 557-570*

### Contexto

El virus del sarcoma de Rous (VSR), el primer virus inductor de cáncer descrito, era de considerable interés como sistema experimental para el estudio de la biología molecular del cáncer. Howard Temin comenzó su investigación en esta área cuando, como estudiante de graduado en 1958, desarrolló el primer método para la transformación de células normales en células cancerosas tras su infección por el VSR. La disponibilidad de un método cuantitativo *in vitro* proporcionó la herramienta necesaria para estudios posteriores de transformación celular y replicación viral. Mientras Temin realizaba dichos estudios, realizó una serie de inesperadas observaciones que indicaron que la replicación de VSR era básicamente distinta de la del resto de virus ARN. Estos experimentos llevaron a Temin a proponer la hipótesis del provirus de ADN, que afirmaba que el ARN viral se copiaba a ADN en las células infectadas-una propuesta que iba directamente en contra del universalmente aceptado dogma central de la biología molecular—.

### Experimentos

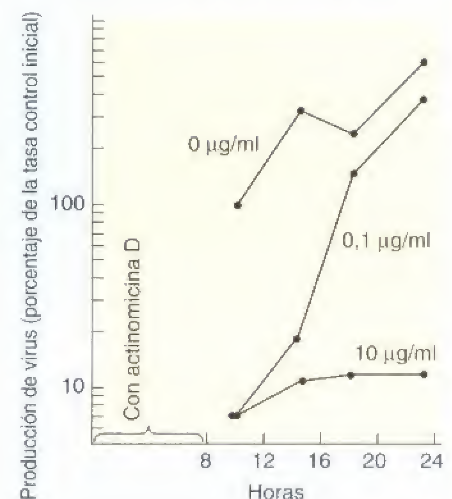
La hipótesis del provirus de ADN se basaba en evidencia experimental de diversas fuentes.

En primer lugar, los estudios de transformación celular utilizando mutantes de VSR indicaron que la información genética del virus determinaba importantes características en las células transformadas. Esta información se transmitía a las células hijas tras cada división, incluso en ausencia de replicación viral. Temin propuso que el genoma viral estaba presente en las células infectadas en una forma estable y heredable, que denominó provirus.

La evidencia de que el provirus se compone de ADN se derivó de experimentos con inhibidores metabólicos. La actinomicina D, que inhibe la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN, inhibía la producción de virus en células infectadas por el VSR (véase la Figura). Por otro lado, los inhibidores de la síntesis de ADN inhibían estadios precoces de la infección celular por VSR. Esto puso de manifiesto que se requería síntesis de ADN al principio de la infección y síntesis de ARN dirigida por ADN para producir virus hijos, lo cual llevó a la propuesta de que el provirus era una copia de ADN del genoma ARN viral. Temin trató de aportar más evidencia utilizando hibridación de ácidos nucleicos para detectar secuencias virales en el ADN de células infectadas, pero la sensibilidad de las técnicas disponibles era limitada y los datos no fueron convincentes.

### Impacto

La hipótesis del provirus de ADN se propuso basándose en experimentos genéticos y en los efectos de inhibidores metabólicos. Era una propuesta radical que contradecía el aceptado dogma central de la biología molecular. En este contexto, la hipótesis de Temin de que el VSR se replicaba transfiriendo su información de ARN a ADN no sólo no fue aceptada por la comunidad científica, sino que fue recibida con sorna generalizada. Sin embargo Temin continuó durante los años 60 sus experimentos tratando de aportar una evidencia más convincente para su hipótesis. Sus esfuerzos culminaron en 1970 con el descubrimiento por Temin y Satoshi Mizutani, e independientemente por David Baltimore, de una enzima viral, conocida ahora como transcriptasa inversa, que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN —una demostración bioquímica inequívoca de que el dogma central podía invertirse—.




La transcripción inversa es importante no sólo en la replicación de los retrovirus sino también en al menos otros dos aspectos de la biología molecular y celular. Primero, la transcripción inversa no es exclusiva de los retrovirus; ocurre también en las células y frecuentemente es responsable de la transposición de secuencias de ADN de una localización cromosómica a otra, como se discu-

### *Hipótesis del provirus de ADN* (continuación)

Temin concluyó su artículo de 1970 con la afirmación de que los resultados «constituyen una fuerte evidencia de que la hipótesis del provirus de ADN es correcta y que los virus tumorales de ARN tienen un genoma de ADN cuando están dentro de las células y un genoma de ARN cuando están en forma de viriones. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones en la carcinogénesis de origen viral y posiblemente en los modelos de transferencia de información en otros sistemas biológicos». Como predijo Temin, el descubrimiento de la síntesis de ADN dirigida por ARN ha llevado a importantes avances en el entendimiento del cáncer, los retrovirus humanos y el reordenamiento genético. La trancriptasa inversa se ha convertido en una herramienta crítica para clonar el ADN, repercutiendo en virtualmente todas las áreas de la biología celular y molecular contemporánea.



Howard Temin

te en el Capítulo 5. Segundo, las enzimas que catalizan la síntesis de ADN dirigida por ARN (**transcriptasas inversas**) se utilizan experimentalmente para generar copias de ADN a partir de una molécula de ARNm. El uso de la transcriptasa inversa ha permitido el estudio del ARNm de células eucarióticas por medio de los métodos moleculares de manipulación del ADN utilizados actualmente, como será expuesto en la siguiente sección.

## ADN recombinante

Los experimentos clásicos en biología molecular fueron llamativamente exitosos en el desarrollo de los conceptos fundamentales sobre la naturaleza y ex-

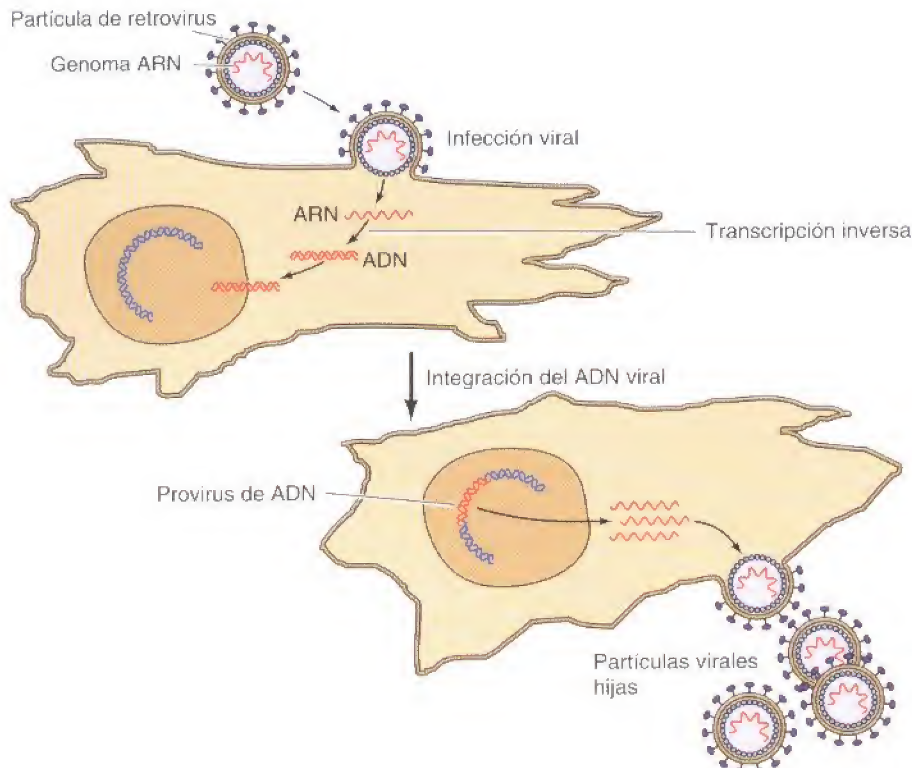



*Figura 3.13*
**Transcripción inversa y replicación de retrovirus.** Los retrovirus contienen genomas de ARN en sus partículas virales. Cuando un retrovirus infecta una célula huésped se sintetiza una copia de ADN del ARN viral por medio de la transcriptasa inversa. Este ADN viral se integra en el ADN cromosómico del huésped para constituir un provirus de ADN, que se transcribe para dar lugar a virus ARN hijos.

presión de los genes. Dado que estos estudios se basaron en el análisis genético, su éxito dependía en gran medida en la elección como modelos de organismos simples y de rápida replicación (como las bacterias y los virus). Sin embargo, no estaba claro cómo se podrían generalizar estos principios fundamentales para proporcionar un entendimiento molecular de la complejidad de las células eucarióticas, teniendo en cuenta que los genomas de la mayoría de los eucariotas (p. ej., el genoma humano) son hasta mil veces más complejos que el de *E. coli*. A principios de los años 70 el panorama de estudiar dichos genomas a un nivel molecular era desalentador. En particular, no parecía haber una manera de aislar y estudiar genes individuales.

Este obstáculo para el progreso de la biología molecular fue superado por el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, que proporcionó a los científicos la posibilidad de aislar, secuenciar y manipular genes individuales derivados de cualquier tipo celular. La aplicación del ADN recombinante ha permitido el estudio molecular detallado de la estructura y función de los genes eucarióticos, revolucionando nuestro entendimiento de la biología celular.

### *Endonucleasas de restricción*

El primer paso en el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante fue la caracterización de las **endonucleasas de restricción** —enzimas que cortan el ADN en lugares concretos y específicos de su secuencia—. Fueron identificadas en bacterias, donde aparentemente cumplen una función defensiva frente a la entrada en la célula de ADN extraño (p. ej., de un virus). Las bacterias poseen una amplia variedad de endonucleasas de restricción que cortan el ADN en más de un centenar de sitios de reconocimiento, cada uno de los cuales consiste en una secuencia específica de entre cuatro y ocho pares de bases (se muestran ejemplos en la Tabla 3.2).

Dado que las endonucleasas de restricción digieren el ADN a nivel de secuencias específicas, pueden ser utilizadas para cortar una molécula de ADN en sitios únicos. Por ejemplo, la endonucleasa de restricción *Eco*RI reconoce las secuencia de seis pares de bases GAATTC. Esta secuencia está presente cinco veces en el ADN del bacteriófago $\lambda$, por lo que digiere el ADN del fago en seis fragmentos de entre 3,6 y 21,2 kilobases de longitud (1 kilobase o kb = 1.000 pares de bases) (Fig. 3.14). Estos fragmentos pueden separarse según su ta-

**TABLA 3.2.** Secuencia de reconocimiento de endonucleasas de restricción representativas

| Enzima[a] | Fuente | Secuencia de reconocimiento[b] |
|---|---|---|
| *Bam*HI | *Bacillus amyloliquefaciens* H | GGATCC |
| *Eco*RI | *Escherichia coli* RY13 | GAATTC |
| *Hae*III | *Haemophilus aegyptius* | GGCC |
| *Hind*III | *Haemophilus influenzae* Rd | AAGCTT |
| *Hpa*I | *Haemophilus parainfluenzae* | GTTAAC |
| *Hpa*II | *Haemophilus parainfluenzae* | CCGG |
| *Mbo*I | *Moraxella bovis* | GATC |
| *Not*I | *Nocardia otitidis-caviarum* | GCGGCCGC |
| *Sfi*I | *Streptomyces fimbriatus* | GGCCNNNNNGGCC |
| *Taq*I | *Thermus aquaticus* | TCGA |

[a] Las enzimas se nombran según la especie de la que se aislaron, seguido por un número para distinguir distintas enzimas aisladas a partir del mismo organismo (p. ej., *Hpa*I y *Hpa*II).
[b] Las secuencias de reconocimiento muestran únicamente la secuencia de una cadena del ADN de doble cadena. «N» representa cualquier base.



## Medicina molecular

# *VIH y sida*

### La enfermedad

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) es una nueva enfermedad, descrita por primera vez en 1981. Se ha convertido en una pandemia a nivel mundial, con más de 47 millones de personas infectadas y más de 14 millones de muertes por sida. En los Estados Unidos es la primera causa de muerte en los hombres de entre 25 y 44 años. Las manifestaciones clínicas se derivan principalmente de la incapacidad del sistema inmune para funcionar con normalidad. En ausencia de una inmunidad normal, los pacientes con sida son sensibles a infecciones oportunistas por agentes (virus, bacterias, hongos y protozoos) a los que un individuo sano es resistente. Los enfermos de sida sufren también una mayor incidencia de determinados tipos de cáncer, particularmente linfomas y sarcoma de Kaposi, aunque las enfermedades oportunistas son responsables de la mayoría de las muertes.

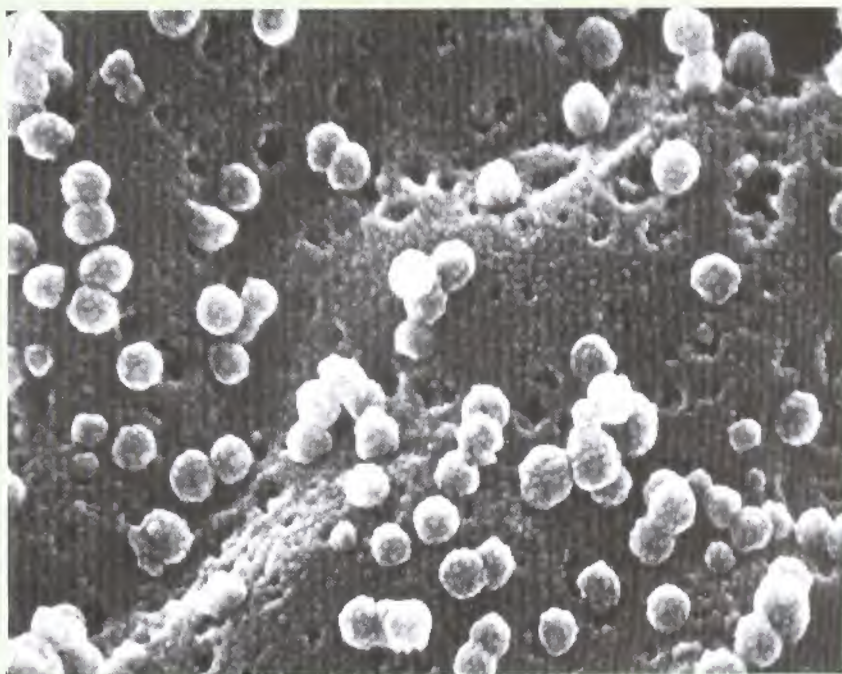
### Bases moleculares y celulares

El sida está causado por un retrovirus (el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH) que fue descubierto por los grupos investigadores de Robert Gallo y Luc Montagnier en 1983. El HIV infecta un tipo específico de linfocito (el linfocito T4) que es necesario para una respuesta inmune normal. Al contrario que otros retrovirus, como el virus del sarcoma de Rous, el VIH no induce la malignización de las células a las que infecta. El VIH finalmente mata las células en las que se replica, produciendo una depleción de linfocitos T4 y el fallo del sistema inmune del individuo afectado. Este fallo del sistema inmune lleva a la aparición de las infecciones oportunistas y de las neoplasias que constituyen el cuadro clínico del sida.

### Prevención y tratamiento

En el momento actual la única forma de prevenir el sida es evitar la infección por el VIH. El VIH es un virus frágil que pierde rápidamente su infectividad fuera del cuerpo, por lo que no se transmite por el contacto casual con una persona infectada. Se puede transmitir de tres maneras: por contacto sexual, a través de hemoderivados contaminados y de la madre al hijo durante el embarazo o la lactancia. Tras el aislamiento del VHI se desarrollaron test de *screening* para garantizar la seguridad de los concentrados de factores de coagulación y otros derivados sanguíneos utilizados en las transfusiones. Prevenir la infección por VIH por otras vías depende de la minimización de los riesgos individuales, con la práctica de sexo seguro y evitando fuentes de sangre contaminada, como las jeringuillas compartidas para la inyección intravenosa de drogas.

Más allá de la modificación de los hábitos individuales para reducir el riesgo de infección, la identificación del VIH como el causante del sida abre ciertas posibilidades para su prevención y tratamiento. La búsqueda de una vacuna para prevenir la infección por VIH se está llevando a cabo de manera activa, aunque determinadas características de la biología del VIH hacen difícil esta vía. De forma alternativa, el desarrollo de fármacos que inhiben la replicación viral ha proporcionado terapias efectivas para los pacientes infectados por VIH. Estos fármacos actúan como inhibidores, bien de la transcriptasa inversa, bien de la proteasa del VIH, que es una enzima necesaria para el procesamiento de las proteínas virales. Las combinaciones de dichos fármacos están prolongando la vida de los enfermos de sida, aunque es necesario seguir trabajando para desarrollar fármacos que sean no sólo más eficaces sino además menos costosos y más prácticos para su uso en países en desarrollo.




Micrografía por barrido de electrones de VIH brotando de un linfocito T. (Cecil Fox / Photo Researches, Inc.)

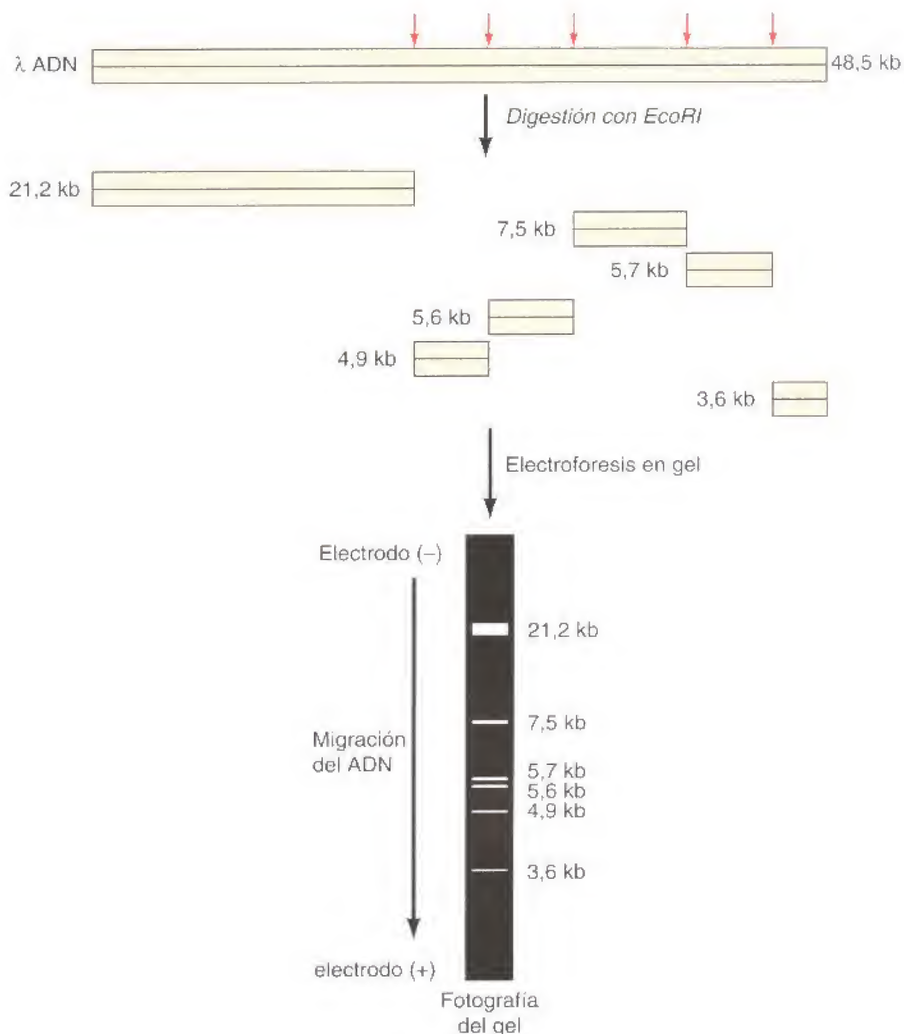



*Figura 3.14*
**Digestión con *Eco*RI y electroforesis del ADN del fago λ.** La enzima *Eco*RI corta el ADN del fago λ por cinco sitios (flechas), produciendo seis fragmentos de ADN. Estos fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN migran hacia el electrodo positivo, desplazándose con más rapidez los de menor tamaño. Tras la electroforesis el ADN se tiñe con un pigmento fluorescente y se fotografía. Se indican los tamaños de los fragmentos de ADN.

maño por medio de **electroforesis en gel** —un método por el que se separan las moléculas basándose en su velocidad de migración en un campo eléctrico. El gel, habitualmente compuesto de agarosa o poliacrilamida, se sitúa entre dos compartimentos con electrodos en los que se dispone un tampón o *buffer.* La muestra (p. ej., la mezcla de fragmentos de ADN para ser analizados) se deposita en ranuras preformadas y se aplica el campo eléctrico. Los ácidos nucleicos tienen carga negativa (debido a los residuos fosfato de su estructura), por lo que migran hacia el electrodo positivo. El gel se comporta como un filtro poroso que retrasa la migración de los fragmentos más grandes. Las moléculas de menor tamaño se mueven a través del gel con mayor rapidez, permitiendo la separación de una mezcla de ácidos nucleicos en función de su tamaño.

El orden de los fragmentos de restricción se puede determinar por una serie de métodos, obteniéndose (por ejemplo) un mapa de los sitios de corte de *Eco*RI en el ADN del fago λ. Se pueden utilizar los sitios de corte de varias endonucleasas de restricción para generar **mapas de restricción** detallados de las moléculas de ADN, como los genomas virales (Fig. 3.15). Es posible aislar con electroforesis fragmentos individuales de ADN producidos por la digestión con endonucleasas de restricción para su estudio posterior —incluyendo la determinación de su secuencia de bases—. De esta forma se han caracterizado los ADNs de muchos virus.

La digestión con endonucleasas de restricción por sí sola no proporciona suficiente resolución para el análisis de moléculas de ADN mayores, como ge-

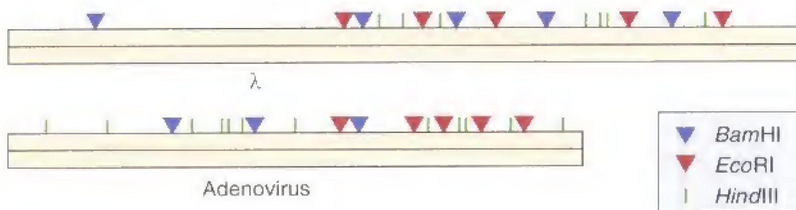



*Figura 3.15*
**Mapas de restricción del ADN de λ y del ADN del adenovirus humano 2.** La localización de los sitios de corte de *Bam*HI, *Eco*RI y *Hin*dIII se muestran en los ADNs del bacteriófago λ de *E.coli* (48,5 kb) y del adenovirus humano 2 (35,9 kb).

nomas celulares. Una endonucleasa de restricción con una secuencia de reconocimento de seis pares de bases (como la *Eco*RI) corta el ADN con una frecuencia estadística de un corte cada 4.096 pares de bases ($1/4^6$). Una molécula como el ADN de λ (48,5 kb) se podría esperar que diera unos diez fragmentos *Eco*RI, lo cual es consistente con los resultados ilustrados en la Fig. 3.16. Sin embargo, la digestión con endonucleasas de restricción de genomas de mayor tamaño proporciona resultados muy distintos. El genoma humano tiene unas $3 \times 10^6$ kb por lo que daría unos 500.000 fragmentos *Eco*RI. Un número tan grande de fragmentos no se pueden separar entre sí y tras la electroforesis en gel de agarosa del ADN humano digerido con *Eco*RI se obtiene una banda continua en vez de un patrón discreto de fragmentos de ADN. Dado que es imposible aislar fragmentos de restricción individuales, la digestión con endonucleasas de restricción por sí misma no proporciona una fuente de ADN homogéneo apropiado para ser estudiado. Sin embargo, se pueden obtener cantidades suficientes de fragmentos de ADN purificado a través de la clonación molecular.

## *Generación de moléculas de ADN recombinante*

La estrategia básica en la **clonación molecular** es insertar un fragmento de ADN de interés (p. ej., un segmento de ADN humano) en una molécula (llamada **vector**) que es capaz de replicarse de forma independiente en una célula huésped. El resultado es una **molécula recombinante** o **clon molecular**, compuesto de las secuencias del ADN insertado y del vector. Se pueden obtener grandes cantidades del ADN insertado si se permite replicarse a la molécula recombinante en un huésped apropiado. Por ejemplo, se pueden clonar fragmentos de ADN humano con el ADN del bacteriófago λ de *E. coli* como vector (Fig. 3.16). Se introducen estas moléculas recombinantes en *E. coli*, donde se reproducen de forma eficaz produciendo millones de fagos hijos que contienen el ADN humano insertado. El ADN de estos fagos puede ser aislado, obteniéndose grandes cantidades de moléculas recombinantes que contienen un fragmento único de ADN humano. Mientras que este fragmento representa el 0,001 % del ADN genómico humano total, constituye el 10 % del genoma total del vector. El fragmento puede ser aislado de manera sencilla del resto del ADN del vector utilizando las mismas endonucleasas de restricción usadas para su inserción y realizando una electroforesis en gel, permitiendo el análisis y posterior manipulación de un fragmento puro de ADN humano.

Los fragmentos de ADN utilizados para crear moléculas de ADN recombinante son generados por digestión con endonucleasas de restricción. Muchas de estas enzimas cortan sus secuencias de reconocimiento de forma escalonada, generando extremos complementarios o cohesivos de una sola hebra que pueden asociarse entre sí por apareamiento complementario de bases (Fig. 3.17). Los extremos complementarios emparejados pueden conectarse de forma definitiva por medio de una **ADN ligasa**, una enzima que repara roturas en las hebras de ADN (véase Cap. 5). De esta forma dos fragmentos distintos de ADN (p. ej., un ADN humano y un ADN del vector λ) acondicionados tras digestión por la misma endonucleasa de restricción pueden ser unidos para crear una molécula de ADN recombinante.

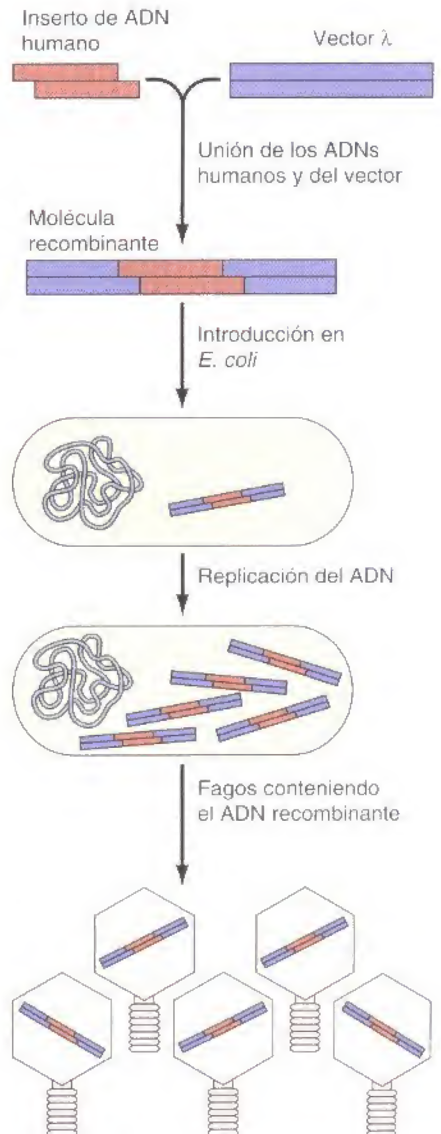



*Figura 3.16*
**Generación de una molécula de ADN recombinante.** Se inserta un fragmento de ADN humano en un vector de ADN λ. La molécula resultante de ADN recombinante se introduce después en *E. coli*, donde se replica para dar fagos hijos que contienen el fragmento insertado de ADN humano.

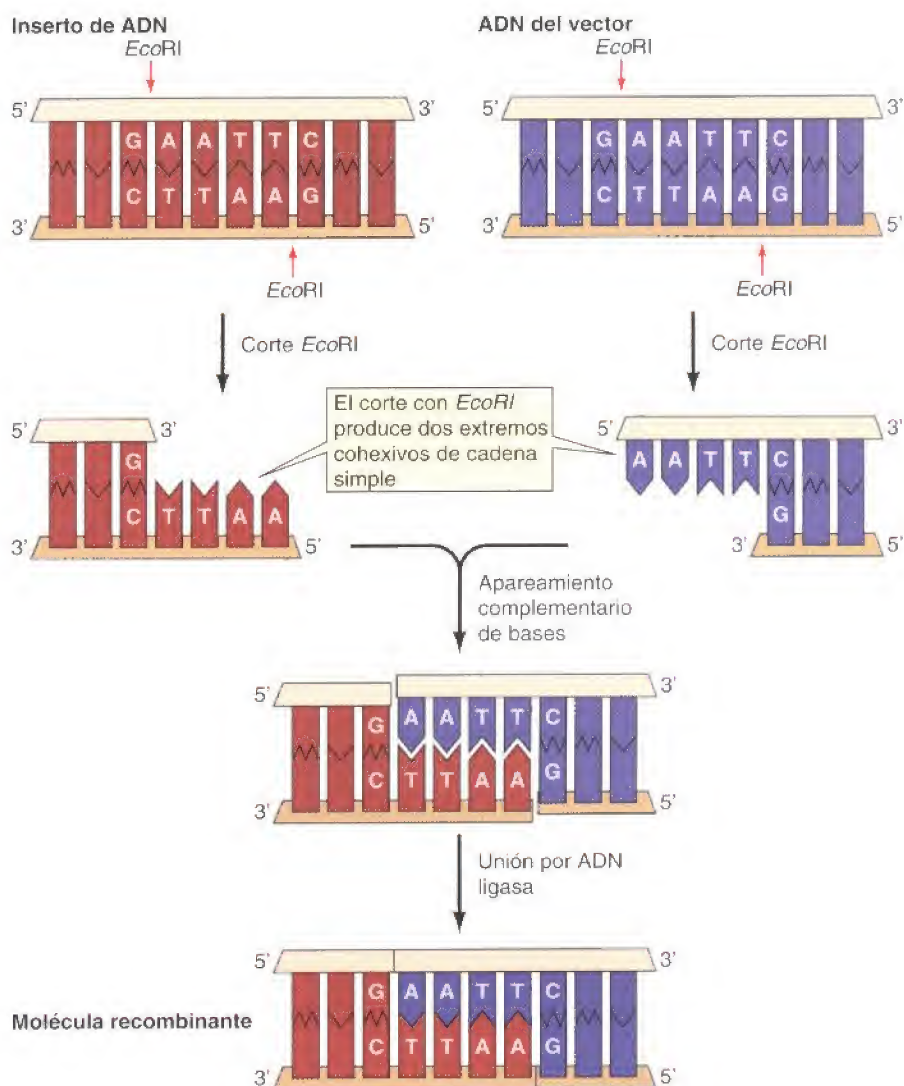



*Figura 3.17*
**Unión de moléculas de ADN.** El ADN pasajero y el del vector se digieren con una endonucleasa de restricción (como la *Eco*RI), que corta en sitios escalonados dejando extremos complementarios de cadena simple. EL ADN que se desea insertar y el del vector se asocian por apareamiento complementario de bases, y la unión covalente de las hebras de ADN por medio de una ADN ligasa produce una molécula recombinante.

Los fragmentos de ADN que pueden ser clonados no se limitan a aquellos que terminan en sitios de corte de enzimas de restricción. Es posible añadir a los extremos de cualquier fragmento de ADN adaptadores o *linkers*, que son secuencias sintéticas que contienen sitios de corte de endonucleasas de restricción. Los adaptadores son oligonucleótidos cortos que se obtienen con facilidad por síntesis química, permitiendo preparar prácticamente cualquier fragmento de ADN para ser ligado a un vector.

Además del ADN, es posible clonar también secuencias de ARN (Fig. 3.18). El primer paso es sintetizar una copia de ADN a partir del ARN por medio de la transcriptasa inversa. El ADN producido (denominado **ADNc** porque es complementario al ARN utilizado como molde) se liga al vector de ADN del modo antes descrito. Dado que los genes eucarióticos están habitualmente interrumpidos por secuencias no codificantes (intrones; véase Cap. 4), que se eliminan del ARNm por corte y empalmado o *splicing*, la posibilidad de clonar ADNc además del ADN genómico ha sido crítica para el entendimiento de la estructura y función de los genes.

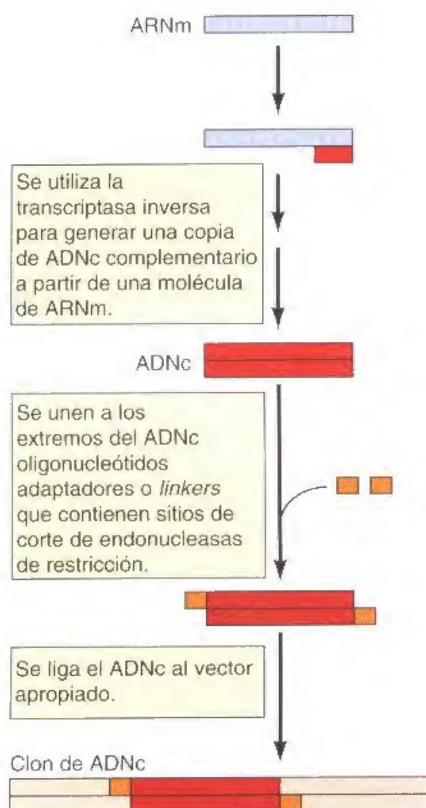



*Figura 3.18*
**Clonación de ADN complementario.**

### *Vectores para el ADN recombinante*

Dependiendo del tamaño del ADN que se inserta y del propósito del experimento es posible utilizar distintos vectores de clonación para generar moléculas recombinantes. Los sistemas más básicos para el aislamiento y propagación de

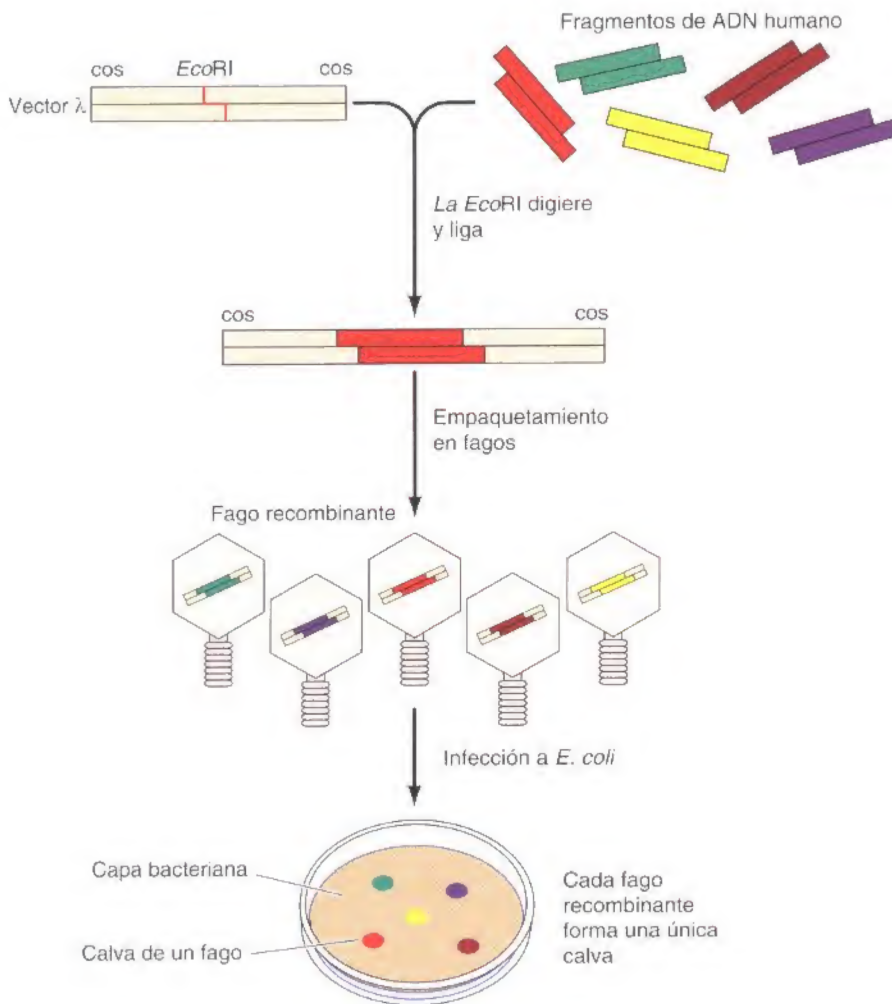



*Figura 3.19*
**Clonación con bacteriófagos λ como vectores.** El vector contiene un sitio de restricción (p. ej., un sitio *Eco*RI) para la inserción de ADNc. Adicionalmente el vector contiene en ambos extremos de su ADN sitios cos (extremos cohesivos), que son necesarios para empaquetar el ADN en los fagos. El ADN pasajero (p. ej., ADN humano) se liga al vector, y las moléculas recombinantes se empaquetan en fagos mezclándose con proteínas virales. Los fagos recombinantes se utilizan para infectar *E.coli*. Cada fago recombinante, que contiene un fragmento único de ADN clonado, forma una calva única en el cultivo bacteriano infectado. La progenie del fago que contiene un fragmento único de ADN se puede aislar de una calva individual y ser cultivada en grandes cantidades.

ADN clonado se exponen aquí. Otros tipos de vectores desarrollados para expresar ADN clonado e introduccir moléculas recombinantes en células eucarióticas se discuten en secciones posteriores.

Los bacteriófagos λ son frecuentemente utilizados como vectores para el aislamiento inicial de ADN genómico o de clones de ADNc de células eucarióticas (Fig. 3.21). En los vectores de clonado λ se han eliminado secuencias prescindibles del genoma viral y han sido reemplazadas por sitios de restricción para insertar ADN clonado. Para conseguir un genoma recombinante que pueda ser empaquetado dentro de los fagos los fragmentos de ADN que se inserten pueden ser de hasta 15 kb. Para aislar clones genómicos de ADN humano, por ejemplo, se ligan fragmentos al azar de ADN humano de un tamaño medio de 15 kb al ADN de los vectores λ. Estas moléculas recombinantes de ADN se empaquetan dentro de partículas de fago mezclándolas con las proteínas del λ (denominadas extractos de empaquetamiento) *in vitro*. Las partículas obtenidas se utilizan para infectar cultivos de *E.coli*. Dado que cada fago recombinante forma una calva única, pueden aislarse recombinantes portadores de un único ADN humano. Con métodos de hibridación de ácidos nucleicos y otras técnicas es posible identificar fagos recombinantes portadores de determinados genes de interés, como será expuesto en la siguiente sección.

Los **plásmidos** (Fig. 3.20) son vectores que permiten una manipulación más sencilla de las secuencias de ADN clonado que los fagos. Los plásmidos son pequeñas moléculas de ADN circular que se replican en el interior de las bacterias de forma independiente (sin necesidad de asociarse al ADN cromosó-

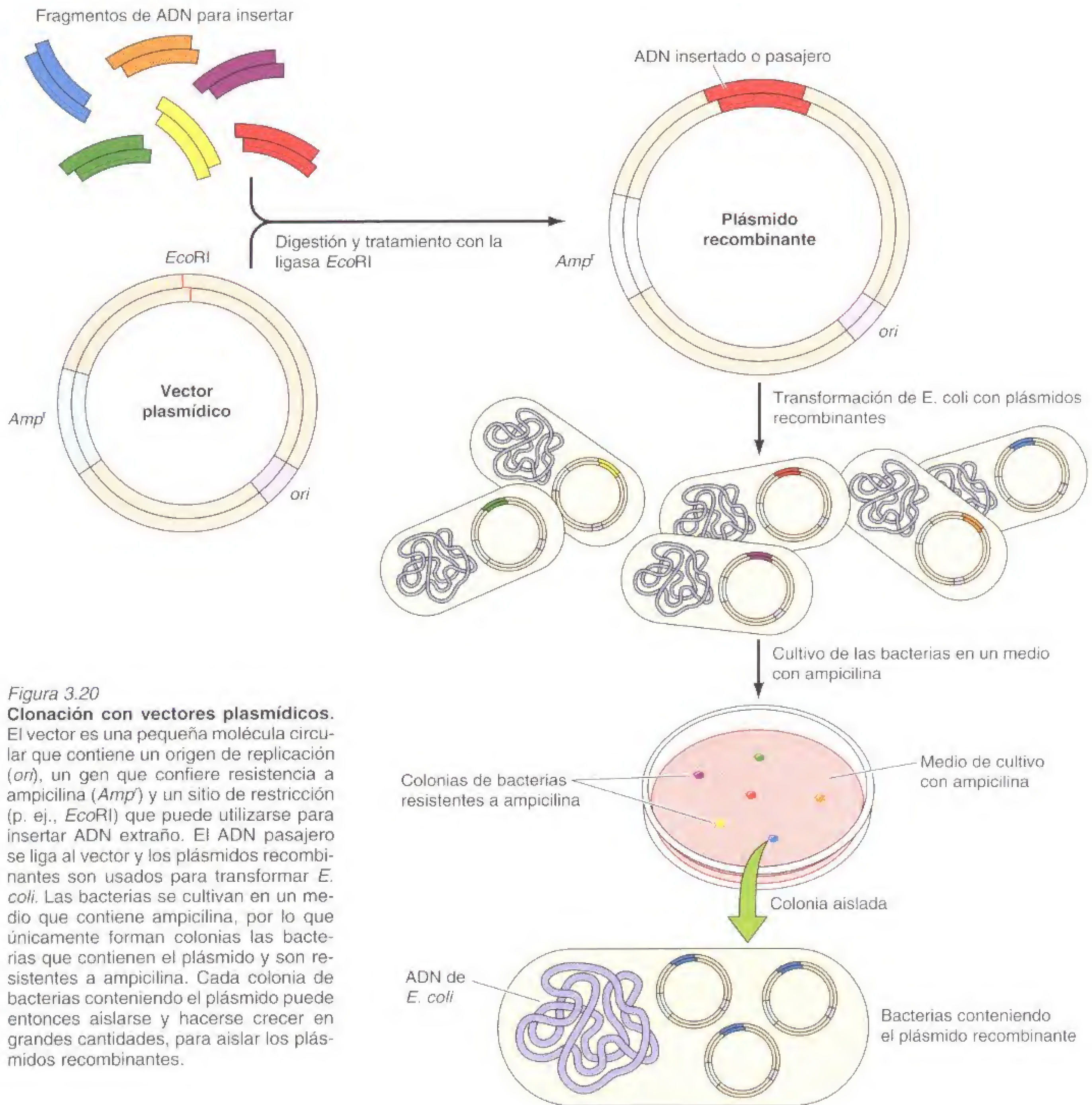



*Figura 3.20*
**Clonación con vectores plasmídicos.** El vector es una pequeña molécula circular que contiene un origen de replicación (*ori*), un gen que confiere resistencia a ampicilina (*Amp*r) y un sitio de restricción (p. ej., *Eco*RI) que puede utilizarse para insertar ADN extraño. El ADN pasajero se liga al vector y los plásmidos recombinantes son usados para transformar *E. coli*. Las bacterias se cultivan en un medio que contiene ampicilina, por lo que únicamente forman colonias las bacterias que contienen el plásmido y son resistentes a ampicilina. Cada colonia de bacterias conteniendo el plásmido puede entonces aislarse y hacerse crecer en grandes cantidades, para aislar los plásmidos recombinantes.

mico). Lo único que se necesita es que en el ADN plasmídico exista un **origen de replicación** —la secuencia de ADN que señaliza el inicio de replicación a la ADN polimerasa de la célula huésped—. Los plásmidos portan genes que confieren resistencia a antibióticos (p. ej., resistencia a la ampicilina), por lo que las bacterias que portan los plásmidos pueden ser seleccionadas. El ADN de los plásmidos contiene únicamente entre 2 y 4 kb de ADN, en contraste con las 30 a 45 kb del ADN de los fagos $\lambda$, facilitando el análisis del fragmento de ADN insertado.

Para clonar utilizando un plásmido como vector, se liga el fragmento de ADN que se desea insertar o pasajero a un sitio de restricción apropiado en el vector

y la molécula recombinante se usa para transformar un cultivo de *E.coli*. Las colonias resistentes, que contienen el plásmido, son seleccionadas. Estas bacterias poseedoras del plásmido se hacen crecer en grandes cantidades y se extrae su ADN. Las pequeñas moléculas circulares de ADN plasmídico, de las que hay centenares de copias por bacteria, se separan del ADN cromosómico bacteriano; el resultado es ADN plasmídico purificado apropiado para el análisis del fragmento insertado.

En determinados estudios de análisis de ADN genómico es preciso clonar fragmentos de ADN mayores de lo que un fago $\lambda$ puede portar. Existen cinco tipos principales de vectores empleados con este fin (Tabla 3.3). Vectores de tipo **cósmico** que acomodan insertos de aproximadamente 45 kb. Estos vectores contienen secuencias del bacteriófago $\lambda$ que permiten el empaquetamiento eficiente del ADN clonado en partículas de fago. Además, los cósmicos contienen orígenes de replicación y genes para la resistencia a antibióticos que son característicos de los plásmidos, de modo que pueden replicarse como plásmidos en el interior de células bacterianas. Otros dos tipos de vectores se derivan del bacteriófago P1, en lugar del bacteriófago $\lambda$. Los vectores derivados del bacteriófago P1, que permiten acomodar fragmentos de ADN de 70 a 700 kb, contienen secuencias que permiten el empaquetamiento de moléculas recombinantes *in vitro* en partículas de fago P1 para a continuación replicarse como plásmidos en *E. coli*. Los vectores de tipo **cromosoma artificial P1 (PAC)** también contienen secuencias del bacteriófago P1, pero se introducen directamente como plásmidos en *E. coli* y pueden acomodar insertos mayores de 130 a 150 kb. Los vectores de tipo **cromosoma artificial de bacteriófago (BAC)** se derivan de un plásmido que ocurre de forma natural en *E. coli* (denominado el factor F). El origen de replicación y otras secuencias del factor F permite a los BAC replicarse como plásmidos estables que contienen insertos de 120 a 300 kb. Fragmentos incluso mayores de ADN (250-400kb) pueden clonarse en vectores de tipo **cromosoma artificial de levadura (YAC)**. Estos vectores contienen orígenes de replicación de levaduras además de otras secuencias (centrómeros y telómeros, estudiados en el Capítulo 4) que les permiten replicarse como moléculas lineares tipo cromosoma en el interior de células de levadura.

## *Secuenciación de ADN*

La clonación molecular de un fragmento individual de ADN permite el aislamiento de las grandes cantidades de material genético necesarias para su estudio detallado, incluyendo la determinación de su secuencia de nucleótidos. La determinación de las secuencias nucleotídicas de un gran número de genes ha permitido estudiar no sólo la estructura de sus productos proteínicos, sino también las propiedades de las secuencias de ADN que regulan la expresión génica. Además, las secuencias codificantes de genes de reciente descubrimiento están relacionadas frecuentemente con las de genes previamente estudiados, y la función de los genes aislados *de novo* se puede con frecuencia deducir correctamente basándose en dichas similitudes.

**TABLA 3.3.** Vectores para clonar fragmentos grandes de ADN

| Vector | Inserto de ADN (kb) | Célula huésped |
|---|---|---|
| Cósmidos | 30-45 | *E. coli* |
| Bacteriófago P1 | 70-100 | *E. coli* |
| Cromosoma artificial P1 (PAC) | 130-150 | *E. coli* |
| Cromosoma artificial bacteriano (BAC) | 120-300 | *E. coli* |
| Cromosoma artificial de levadura (YAC) | 250-400 | Levadura |

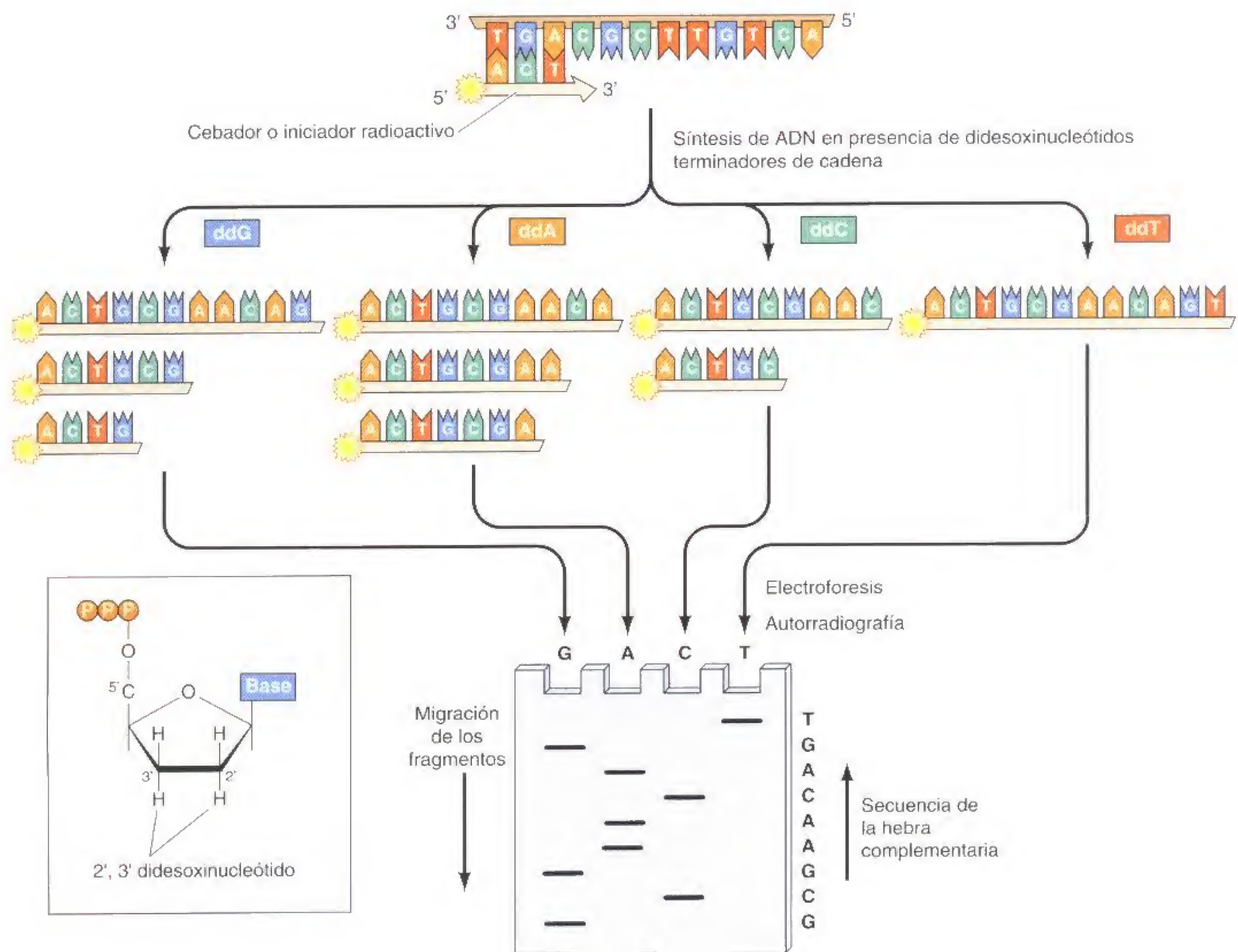



*Figura 3.21*
**Secuenciación de ADN por el método de Sanger.** Los didesoxinucleótidos, que carecen de los grupos OH en las posiciones 2′ y 3′, se usan para interrumpir la síntesis de ADN en bases específicas. Estas moléculas se incorporan de forma normal a la hebra de ADN. Sin embargo, dado que carecen del OH 3′, el siguiente nucleótido no puede ser añadido y se para la síntesis. La síntesis de ADN comienza con un cebador o *primer* radioactivo. Se llevan a cabo cuatro reacciones distintas, cada una con un didesoxinucleótido mezclado con su homólogo normal y los otros tres nucleótidos normales. Cuando se incorpora el didesoxinucleótido se para la síntesis de ADN, por lo que cada reacción produce una serie de fragmentos que empiezan en el iniciador y acaban en la base sustituida por el didesoxinucleótido. Los productos de cada reacción se separan por electroforesis y se analizan por autorradiografía para determinar la secuencia de ADN.

Los métodos actuales de secuenciación de ADN son rápidos y precisos, y la determinación de una secuencia de varias kilobases es una tarea sencilla para la mayoría de los laboratorios de biología molecular. De este modo, es mucho más fácil clonar y secuenciar ADN que determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína. Dado que la secuencia de nucleótidos de un gen puede traducirse fácilmente a la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, la manera más sencilla de determinar la secuencia de una proteína es secuenciar un gen clonado o ADNc.

El método más común de secuenciación de ADN se basa en la interrupción prematura de la síntesis de ADN por la inclusión de **didesoxinucleótidos** (que no contienen el grupo hidroxilo en 3′) terminadores de cadena en reacciones de la ADN polimerasa (Fig. 3.21). Se inicia la síntesis de ADN a partir de un iniciador o cebador que ha sido marcado con un radioisótopo en su extremo 5′, en cuatro medios a la vez. Cada medio de incubación contiene, además de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, el análogo didesoxi de uno de ellos. La incorporación de un didesoxinucleótido paraliza la síntesis porque no hay grupo 3′ al que añadir otro nucleótido. Se genera entonces una serie de moléculas de ADN marcado de distinta longitud que contienen en el extremo 3′ el análogo didesoxi de la base que estaba codificada. Estos fragmentos se separan por electroforesis según su tamaño y se detectan por la exposición del gel a una película radiográfica (**autorradiografía**). El tamaño de cada fragmento está de-

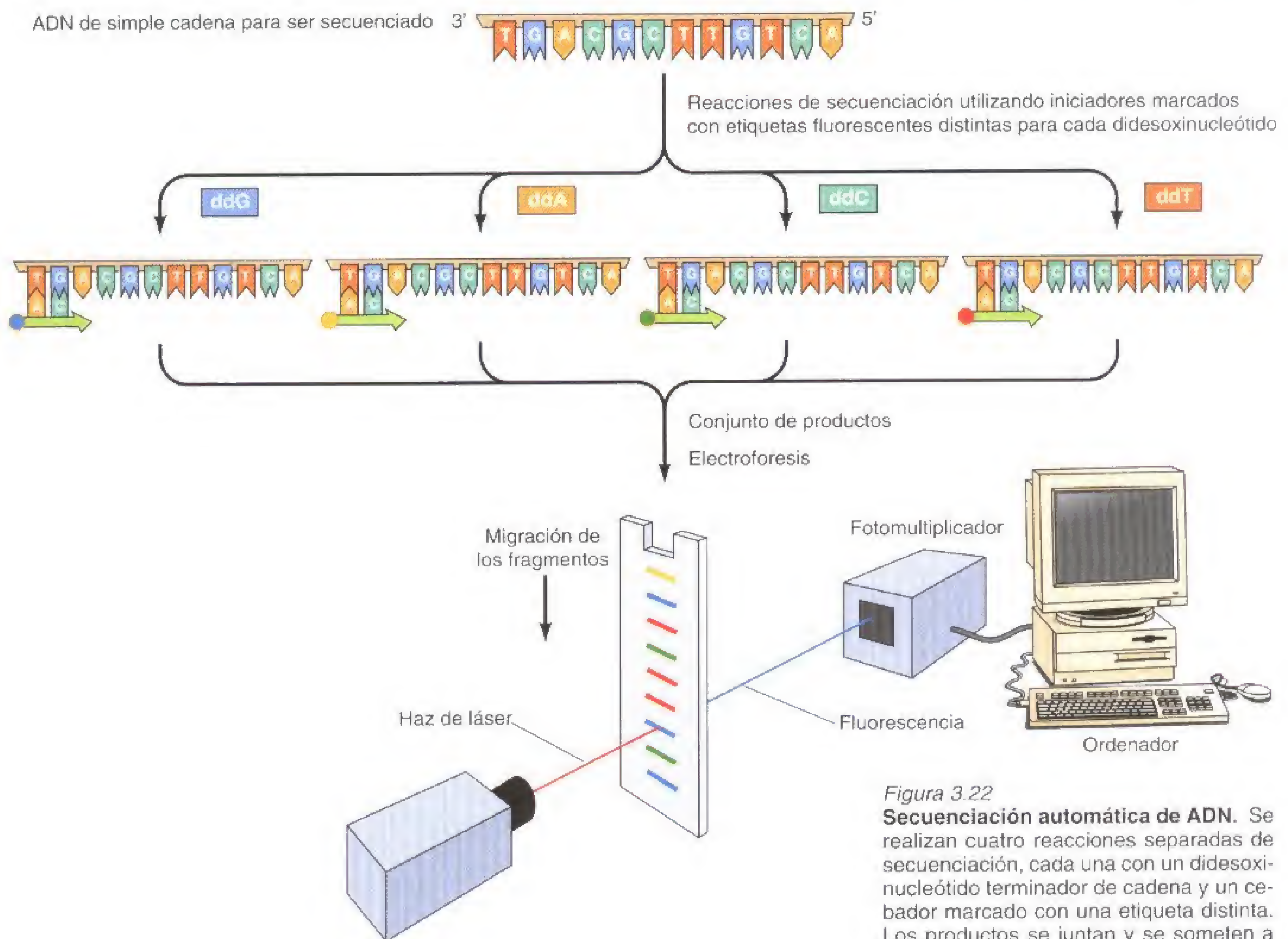



*Figura 3.22*
**Secuenciación automática de ADN.** Se realizan cuatro reacciones separadas de secuenciación, cada una con un didesoxinucleótido terminador de cadena y un cebador marcado con una etiqueta distinta. Los productos se juntan y se someten a electroforesis. A la vez que las hebras de ADN migran en el gel, pasan a través de un haz de láser que excita el marcador fluorescente. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador conectado a un ordenador que recoge y analiza los datos.

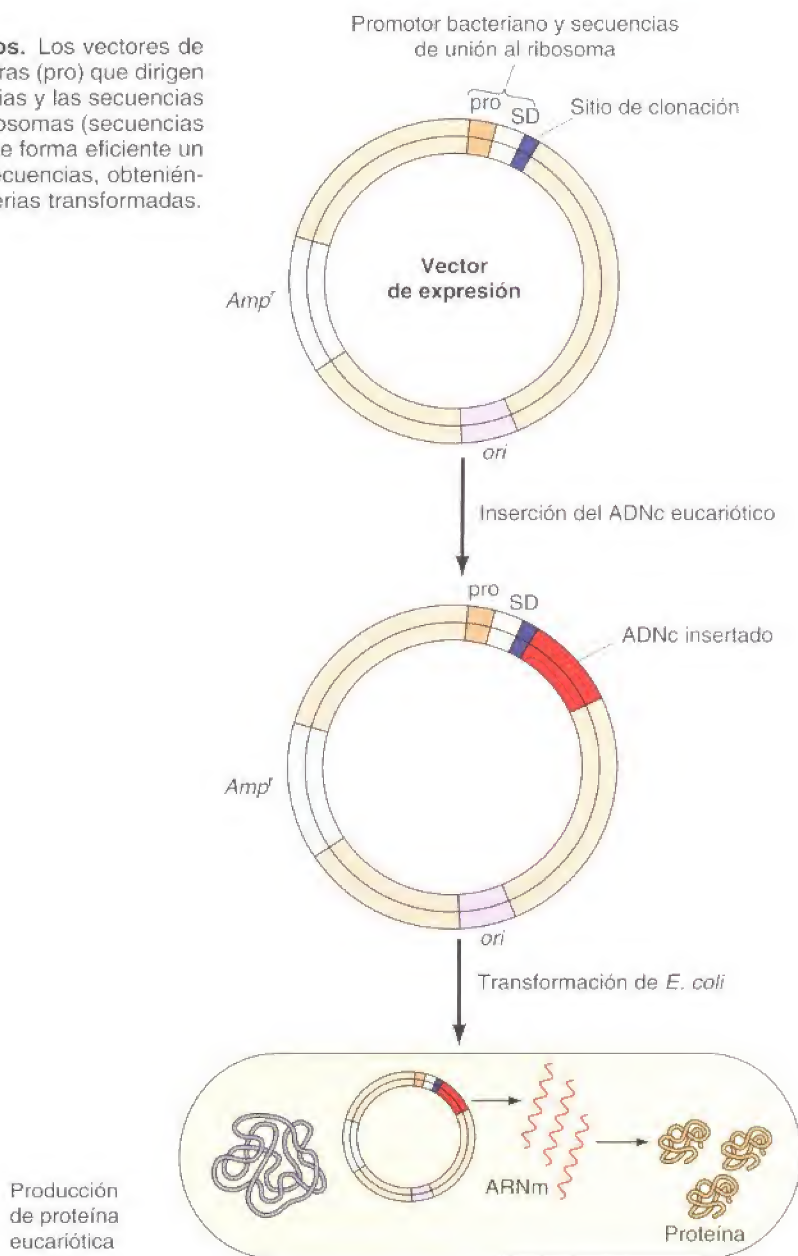
terminado por su desoxinucleótido terminal, por lo que la secuencia de ADN se corresponde con el orden de los fragmentos en el gel.

La secuenciación de ADN a gran escala se realiza frecuentemente con sistemas automáticos, que utilizan iniciadores o cebadores fluorescentes en reacciones de secuenciación con didesoxinucleótidos (Fig. 3.22). Las hebras de ADN sintetizadas se someten a electroforesis y se van pasando a través de un haz de laser que excita el marcador fluorescente. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador, y un ordenador recoge y analiza los datos. Este tipo de secuenciación automática de ADN ha permitido el análisis a gran escala necesario para la determinación de la secuencia completa del genoma humano, además de las secuencias del genoma de un número de especies de bacterias, levaduras, *Arabidopsis, C. elegans, Drosophila* y el ratón.

## *Expresión de genes clonados*

Además de permitir la determinación de la secuencia de nucleótidos de los genes —y por lo tanto la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas— la clonación molecular ha proporcionado nuevas posibilidades en la obtención de grandes cantidades de proteínas para su caracterización estructural y funcional. Muchas proteínas de interés están presentes a muy baja concentración en células eucarióticas y por lo tanto no pueden purificarse en cantidades significativas por técnicas bioquímicas convencionales. Sin embargo una vez clona-

*Figura 3.23*
**Expresión en bacterias de genes clonados.** Los vectores de expresión contienen las secuencias promotoras (pro) que dirigen la transcripción del ADN insertado en bacterias y las secuencias necesarias para la unión del ARNm a los ribosomas (secuencias Shine-Delgarno [SD]). Es posible expresar de forma eficiente un ADNc eucariótico insertado junto a estas secuencias, obteniéndose proteínas eucarióticas a partir de bacterias transformadas.




do su gen este problema puede ser solucionado con el desarrollo de vectores que consigan altos niveles de expresión genética en bacterias o células eucarióticas.

Para expresar un gen eucariótico en *E. coli* el ADNc de interés se clona con un fago o un plásmido (denominados **vectores de expresión**) que contenga las secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen insertado en bacterias (Fig. 3.23). Los genes insertados se llegan a expresar a niveles tales que la proteína codificada por el gen clonado supone el 10 % del total de la producción de proteína bacteriana. La purificación posterior de cantidades suficientes de la proteína para estudios bioquímicos o estructurales es una tarea sencilla.

En ocasiones es más útil expresar un gen clonado en una célula eucariótica, en lugar de hacerlo en una bacteria. Este modo de expresión es importante, por ejemplo, para asegurarse de que las modificaciones postraduccionales de la

proteína (como la adición de carbohidratos o lípidos) se producen de forma normal. La expresión de proteínas en células eucarióticas se consigue insertando el gen clonado en un vector (habitualmente derivado de un virus) que induce una expresión génica de alto nivel. Un sistema utilizado a menudo para expresar proteínas en células eucarióticas es la infección de células de insecto por un vector **baculovirus**, que induce altos niveles de expresión de genes insertados en el lugar de una proteína estructural viral. Alternativamente es posible obtener altos niveles de expresión proteínica usando vectores adecuados en células de mamífero. La expresión de genes clonados en levaduras es particularmente útil porque se pueden emplear técnicas genéticas sencillas para identificar proteínas que interactúan con otras proteínas clonadas o con secuencias de ADN específicas.

## *Amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa*

La clonación molecular permite producir y aislar grandes cantidades de un ADN en particular. La **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**), desarrollada por Kary Mullis en 1988, es un método alternativo para conseguir un gran número de fragmentos de material genético a partir de una única copia de ADN. Siempre que se conozca parte de la secuencia de la molécula de ADN, la PCR puede conseguir una gran amplificación del ADN por medio de reacciones llevadas a cabo completamente *in vitro*. La ADN polimerasa se emplea para replicar repetidamente un segmento determinado de ADN. El número de secuencias de ADN va incrementando de modo exponencial, doblándose con cada ciclo de replicación, por lo que se puede obtener una cantidad sustancial de copias a partir de un pequeño número de moldes de ADN iniciales. Por ejemplo, una única molécula de ADN sometida a 30 ciclos de amplificación da lugar a $2^{30}$ copias (aproximadamente mil millones). Por tanto se pueden amplificar moléculas únicas de ADN para producir cantidades fácilmente detectables de ADN, que pueden aislarse por clonación molecular o ser analizadas directamente por digestión con endonucleasas de restricción o secuenciación de nucleótidos.

El proceso de amplificación de ADN por PCR se muestra en la Figura 3.24. El material de partida puede ser bien un fragmento de ADN clonado o una mezcla de moléculas de ADN —por ejemplo, todo el ADN de células humanas—. A partir de esta mezcla es posible amplificar una región especifica de ADN, siempre que conozcamos la secuencia de nucleótidos que rodea dicha región para poder diseñar cebadores o *primers* que comiencen la síntesis de ADN en el punto deseado. Los cebadores son habitualmente oligonucleótidos sintetizados químicamente compuestos de 15 a 20 bases de ADN. Dos iniciadores comienzan la síntesis de ADN en direcciones opuestas desde hebras opuestas. La reacción empieza calentando el ADN diana a altas temperaturas (p. ej., 95 °C) lo cual separa las hebras. Se desciende la temperatura para que los cebadores se emparejen con sus secuencias complementarias en las hebras del ADN. La ADN polimerasa utiliza los cebadores para sintetizar una nueva hebra complementaria sobre cada hebra de ADN preexistente. En un ciclo de amplificación se obtienen dos moléculas de ADN nuevas a partir de la original. El proceso se puede repetir múltiples veces, doblándose el número de moléculas de ADN en cada ciclo de amplificación.

Los múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento se llevan a cabo por medio de sistemas térmicos programables denominados termocicladores. Las ADN polimerasas empleadas son enzimas termoestables de bacterias como *Thermus aquaticus*, que viven en manantiales calientes a temperaturas de unos 75 °C. Estas polimerasas son estables incluso a las altas temperaturas empleadas para separar las hebras del ADN de doble hebra, por lo que la amplificación de ADN se puede realizar de modo rápido y automático. Es posible amplificar secuencias de ARN por este método, sintetizando una copia de ADNc por medio de la transcriptasa inversa previamente a la amplificación por PCR.

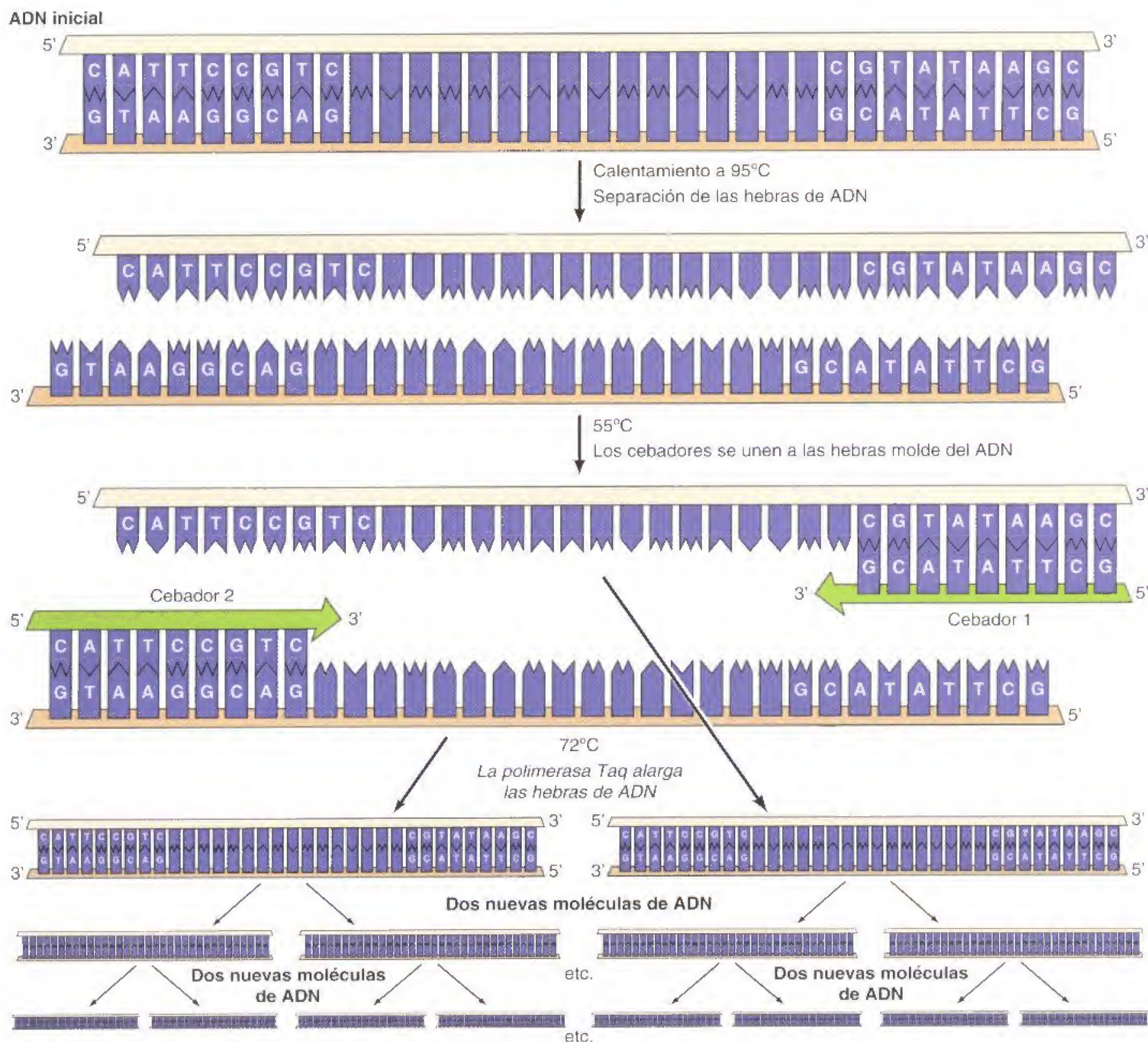



*Figura 3.24*
**Amplificación del ADN por PCR.** La región de ADN que se desea amplificar está flanqueada por dos secuencias utilizadas para cebar la síntesis de ADN. El ADN de doble cadena inicial se calienta para separar las hebras y después se enfría para permitir que los cebadores (habitualmente oligonucleótidos de entre 15 y 20 bases) se unan a cada hebra de ADN. La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (polimerasa *Taq*) se usa para sintetizar nuevas hebras de ADN empezando en los cebadores, produciéndose la formación de dos nuevas moléculas de ADN. El proceso se puede repetir múltiples veces, consiguiéndose en cada ciclo una amplificación del doble de ADN.

Si se conoce suficiente de la secuencia de una gen como para especificar los cebadores, la amplificación por PCR proporciona un método extremadamente potente para obtener cantidades fácilmente detectables y manipulables de ADN a partir de un material inicial que puede contener únicamente unas pocas copias de la secuencia de ADN deseada mezcladas con otras muchas moléculas de ADN. Por ejemplo, es posible amplificar secuencias definidas de ADN de varias kilobases a partir del ADN genómico completo, o se puede amplificar un determinado ADNc partiendo del ARN celular completo. Después estos segmentos de ADN amplificado pueden ser manipulados o analizados para, por ejemplo, detectar mutaciones en un gen concreto. La PCR es una potente aportación al arsenal de técnicas de ADN recombinante. Su potencia se pone particularmente de manifiesto en aplicaciones tales como el diagnóstico de enfermedades hereditarias, los estudios de la expresión génica durante el desarrollo y la medicina forense.

## Detección de ácidos nucleicos y proteínas

El desarrollo de la clonación molecular ha permitido el aislamiento y caracterización de genes individuales de células eucarióticas. Sin embargo, la comprensión de la función de los genes en las células precisa del análisis de la organización y expresión intracelular de los genes y las proteínas que codifican. En esta sección se discuten los procedimientos básicos disponibles para la detección de ácidos nucleicos y proteínas. Estas técnicas son importantes en una amplia variedad de estudios, incluyendo el mapeo de genes y cromosomas, el análisis de la expresión génica y la localización de proteínas y organelas subcelulares. Estos mismos procedimientos generales se usan para aislar genes específicos para ser clonados.

### *Hibridación de ácidos nucleicos*

La clave para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos es el apareamiento de bases entre hebras complementarias de ARN o ADN. Sometidas a altas temperaturas (p. ej., 90 a 100 °C) las hebras complementarias de ADN se separan (desnaturalización) dando moléculas de cadena simple. Si dichas hebras desnaturalizadas de ADN se incuban en condiciones adecuadas (65 °C), renaturalizarán para formar moléculas de doble cadena por apareamiento complementario de bases —un proceso denominado **hibridación de ácidos nucleicos**—. Pueden hibridar entre sí dos hebras de ADN, dos hebras de ARN y una de ADN con otra de ARN.

La hibridación de ácidos nucleicos proporciona un método para detectar secuencias de ADN o ARN complementarias a cualquier ácido nucleico conocido, como un genoma viral o una secuencia de ADN clonada (Fig. 3.25). El ADN clonado se marca radiactivamente, habitualmente siendo sintetizado en presencia de nucleótidos radiactivos. Este ADN radiactivo se utiliza como **sonda** para la hibridación de secuencias complementarias de ADN o ARN, que se detectan en virtud de la radioactividad de las moléculas híbridas de doble cadena.

La **transferencia Southern** o *Southern blotting* (técnica desarrollada por E. M. Southern) se utiliza de modo generalizado para la detección de genes específicos en el ADN celular (Fig. 3.26). El ADN problema es digerido por una endonucleasa de restricción, y los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis. El gel se adhiere a un filtro de nitrocelulosa o nylon, al cual se transfieren los fragmentos de ADN, para dar una réplica del gel. El filtro se incuba posteriormente con una sonda marcada, que hibrida con los fragmentos de ADN que contienen la secuencia complementaria. Los fragmentos se visualizan tras exposición del filtro a una película radiográfica.

La **transferencia Northern** o *Northern blotting* es una variante de la técnica de transferencia de Southern, utilizada para la detección de ARN en vez de ADN. La totalidad del ARN celular es extraída y fraccionada según su tamaño por electroforesis en gel. De igual forma que en la transferencia de Southern, los ARNs se transfieren a un filtro y se detectan por hibridación con una sonda radiactiva. La transferencia de Northern se usa con frecuencia en estudios sobre expresión génica —por ejemplo para determinar la presencia de ARNm específicos en distintos tipos celulares.

En lugar de analizar un gen cada vez, como en la transferencia Southern o Northern, la hibridación a **microarrays de ADN** permite el análisis simultáneo de miles de genes. A medida que se han hecho disponibles las secuencias completas de genomas eucarióticos, la hibridación a microarrays de ADN ha permitido a los investigadores realizar análisis globales de secuencias presentes en muestras celulares de ADN o ARN. Un microarray de ADN consiste en una lámina de cristal o membrana sobre la que se imprimen oligonucleótidos o fragmentos de ADNc por un sistema de robótica en pequeños puntos a una elevada densidad (Fig. 3.27). Cada punto del array consiste en un solo oligonucleótido o ADNc. Más

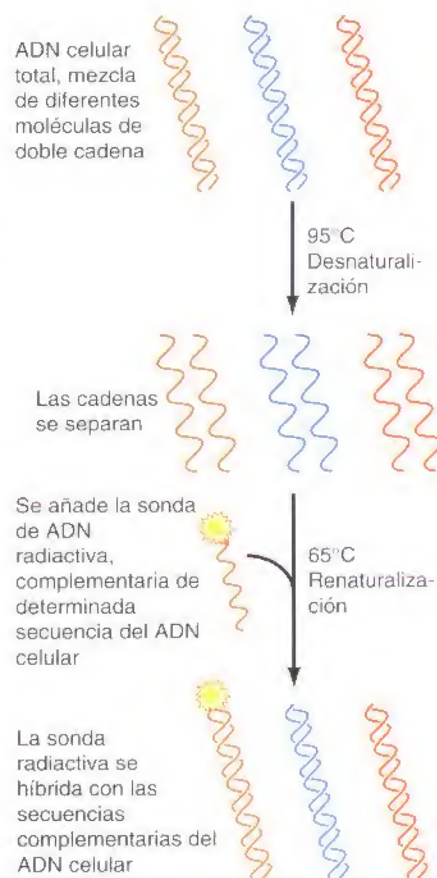



*Figura 3.25*
**Detección de ADN por hibridación de ácidos nucleicos.** Puede detectarse una secuencia específica entre todo el ADN celular por hibridación con una sonda de ADN marcada radiactivamente. Se desnaturaliza el ADN calentándolo hasta 95 °C, obteniéndose moléculas de cadena única. Se añade la sonda marcada radiactivamente y se baja la temperatura hasta los 65 °C, permitiendo que las cadenas de ADN complementarias se apareen entre sí. La sonda marcada se hibrida con las secuencias complementarias del ADN celular, que pueden ser detectadas entonces como moléculas radiactivas de doble cadena.

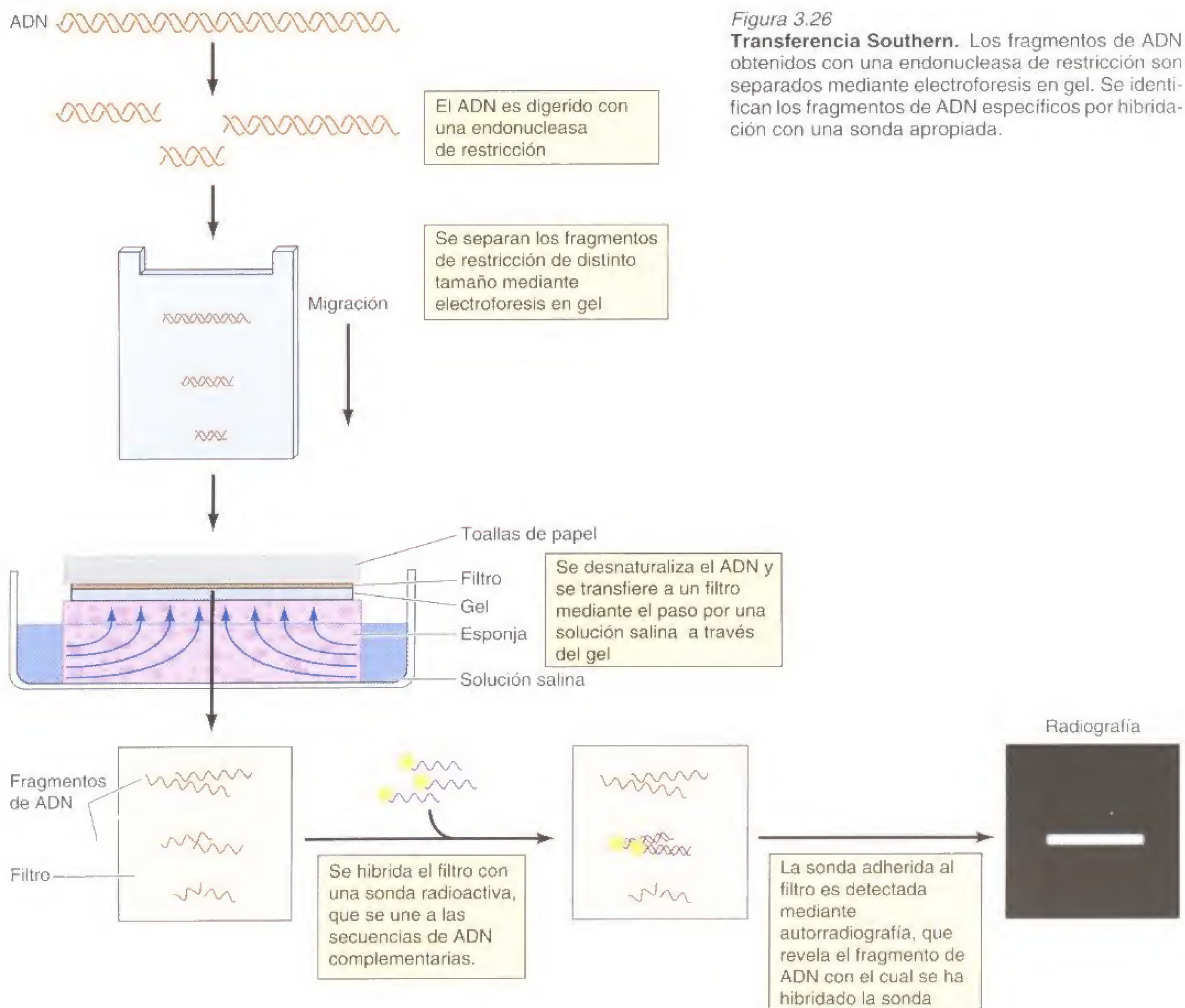



*Figura 3.26*
**Transferencia Southern.** Los fragmentos de ADN obtenidos con una endonucleasa de restricción son separados mediante electroforesis en gel. Se identifican los fragmentos de ADN específicos por hibridación con una sonda apropiada.

de 10.000 secuencias únicas de ADN pueden ser impresas sobre un portaobjetos de cristal típico para microscopía, de modo que es posible producir microarrays de ADN que contienen secuencias que representan a todos los genes de un genoma celular. Tal y como se ilustra en la Figura 3.27, una de las aplicaciones más comunes de los microarrays de ADN es para los estudios de expresión génica, por ejemplo una comparación de los genes expresados por dos tipos de células diferentes. En un experimento de este tipo, las sondas de ADNc se sintetizan a partir de los ARNm expresados en cada uno de los dos tipos celulares (p. ej., células cancerosas y normales). Los dos ADNc se marcan con colorantes fluorescentes diferentes (generalmente rojo y verde), y una mezcla de los ADNc se hibrida con un microarray de ADN en el que 10.000 o más genes humanos están representados como puntos aislados. A continuación se analiza el array mediante el uso de un escáner láser de alta resolución, y la cantidad relativa de transcripción de cada gen en las células cancerosas comparada con la de las células normales está indicada por la relación entre fluorescencia roja y verde en cada punto del array.

La hibridación de ácidos nucleicos se emplea para detectar secuencias de ADN o ARN homólogas no sólo en extactos celulares, sino también en cromoso-

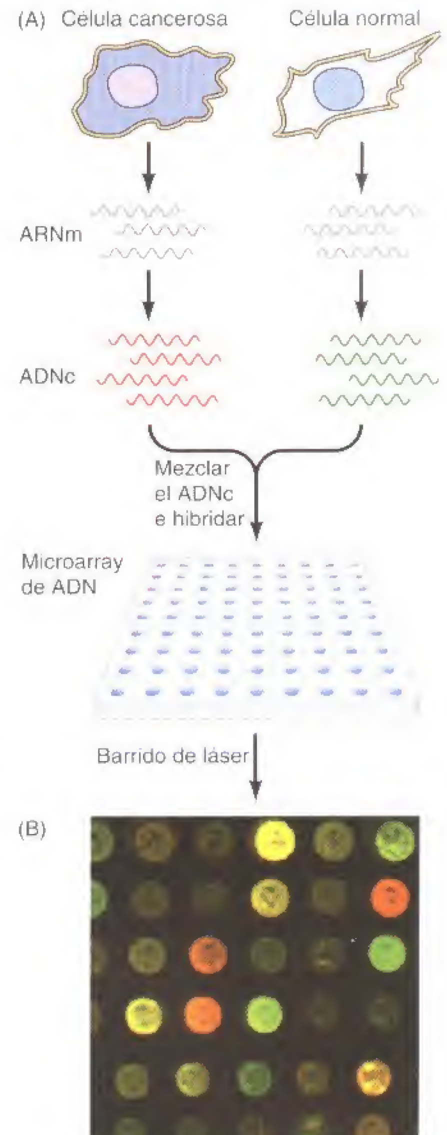



*Figura 3.27*
**Microarrays de ADN.** (A) Un ejemplo del análisis comparativo de la expresión génica entre células cancerosas y normales se emplea como molde para la síntesis de sondas de ADNc marcadas con diferentes colorantes fluorescentes (p. ej., una sonda fluorescente roja para el ADNc de una célula cancerosa y una verde para el ADNc de una célula normal). Las dos sondas de ADNc se mezclan y se hibridan con un microarray de ADN que contiene puntos de oligonucleótidos que corresponden a 10.000 o más genes humanos diferentes. El nivel relativo de expresión de cada gen en células cancerosas comparado con células normales viene indicado por la relación entre la fluorescencia roja y verde en cada posición del microarray. (B) Fotografía de una porción de un microarray.

mas o células intactas —un proceso denominado **hibridación *in situ*** (Fig. 3.28). Con esta técnica se analiza la hibridación de sondas radiactivas o fluorescentes por medio del microscopio. Por ejemplo, se emplean sondas marcadas para hibridar con cromosomas intactos con el fin de identificar la región del cromosoma que contiene un gen determinado. La hibridación *in situ* puede también emplearse para detectar ARNm específicos en los distintos tipos celulares de un tejido.

## *Detección de pequeñas cantidades de ADN o ARN por PCR*

La amplificación de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa es una técnica mucho más sensible que las transferencias de Southern o de Northern en la detección de secuencias de ADN o ARN celular. Se precisan aproximadamente unas 100.000 copias de una secuencia de ADN o ARN para ser detectada por hibridación por transferencia, mientras que la PCR puede amplificar una única copia de ADN (o de ARN tras transcripción inversa) hasta niveles fácilmente detectables.

Como fue expuesto con anterioridad, la especificidad de la amplificación por PCR viene dada por la utilización de oligonucleótidos cebadores que hibridan con secuencias complementarias del molde de ADN. Por lo tanto, la PCR puede amplificar de modo selectivo una molécula de ADN específica a partir de una mezcla compleja, como el ADN o ARN celular total. Es posible utilizar la amplificación por PCR para detectar moléculas de ADN o ARN específicas a partir de cantidades muy pequeñas de material inicial, como extractos o células únicas. Esta extraordinaria sensibilidad ha convertido la PCR en un método fundamental en muchos procedimientos, incluyendo el análisis de la expresión génica en células disponibles en limitadas cantidades.

## *Sondas de anticuerpos para proteínas*

Los estudios acerca de la expresión y función génica requieren no sólo la detección de ADN y ARN, sino también de proteínas específicas. En dichos estudios los **anticuerpos** ocupan el lugar de las sondas de ácidos nucleicos como reactantes que interaccionan de modo selectivo con moléculas proteínicas. Los anticuerpos son proteínas sintetizadas por determinadas células del sistema inmune (los linfocitos B) que reaccionan con moléculas (**antígenos**) que el organismo huésped ha reconocido como extrañas —por ejemplo, la cubierta proteínica de un virus. Los sistemas inmunes de los vertebrados son capaces de sintetizar millones de anticuerpos diferentes, cada uno de los cuales reconoce de forma específica un antígeno en particular, que puede ser una proteína, un hidrato de carbono o una molécula no biológica. Cada linfocito produce un único tipo de anticuerpo, pero los genes responsables de la codificación de anticuerpos varían de un linfocito a



*Figura 3.28*
**Hibridación *in situ* por fluorescencia.** Hibridación de los cromosomas humanos con sondas fluorescentes específicas para los cromosomas, que marcan cada uno de los 24 cromosomas de un color diferente. (Cortesía de Thomas Reid y Hesed Padilla-Nash, *National Cancer Institute*).

otro como resultado de un proceso programado de reordenamiento génico que tiene lugar durante el desarrollo del sistema inmune (véase Cap. 5). Esta variación da lugar a un amplio espectro de linfocitos con distintos genes codificantes de anticuerpos, programados para responder contra distintos antígenos.

Los anticuerpos se generan mediante la inoculación de una proteína extraña en un animal. Por ejemplo, frecuentemente se obtienen anticuerpos contra proteínas humanas a partir de conejos. El suero de estos animales inmunizados contiene una mezcla de anticuerpos (producidos por distintos linfocitos) que reaccionan contra zonas distintas del mismo antígeno. Sin embargo, es posible obtener el mismo tipo de anticuerpo (**anticuerpos monoclonales**) cultivando líneas clonales de linfocitos B de animales inmunizados (habitualmente ratones). Dado que cada linfocito está programado para producir un tipo único de anticuerpo, una línea clonal o clon de linfocitos produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un único determinante antigénico, proporcionando un reactante inmunológico de alta especificidad.

Pueden utilizarse otros materiales para producir inmunización y sintetizar anticuerpos, aparte de proteínas celulares purificadas. Por ejemplo, es posible inmunizar animales con células intactas para crear anticuerpos contra proteínas desconocidas expresadas por una línea celular específica (p. ej., una célula neoplásica). Dichos anticuerpos se utilizan para identificar proteínas específicas expresadas por la línea celular utilizada en la inmunización. Es frecuente producir anticuerpos contra proteínas expresadas en bacterias como clones recombinantes. La clonación molecular permite la obtención de anticuerpos dirigidos contra proteínas eucarióticas de difícil aislamiento. También es posible crear anticuerpos contra péptidos sintéticos de entre 10 y 15 aminoácidos, en vez de contra la proteína completa. Por lo tanto, una vez que se conoce la secuencia de un gen, se pueden producir anticuerpos dirigidos contra péptidos que constituyen parte de la secuencia proteínica. Dado que los anticuerpos contra estos péptidos sintéticos habitualmente también reaccionan contra la proteína completa, es posible producir anticuerpos contra una proteína partiendo únicamente de la secuencia de un gen clonado.

Los anticuerpos pueden ser utilizados de distintas maneras para detectar proteínas en extractos celulares. La **inmunotransferencia** (también denominada **transferencia Western** o *Western blotting*) y la **inmunoprecipitación** son dos métodos habituales. La transferencia Western (Fig. 3.29) es otra variación de la transferencia Southern. Las proteínas procedentes de extractos celulares son separadas por electroforesis en gel según su tamaño. Dado que las proteínas tienen formas y cargas eléctricas diferentes este proceso requiere una modificación del método utilizado para la electroforesis de ácidos nucleicos. Las proteínas se separan por una técnica denominada electroforesis en gel de **SDS-poliacrilamida** (**SDS-PAGE**, *SDS-poliacrylamide gel electroforesis*), en la cual son disueltas en una solución con el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), cargado negativamente. Cada proteína se une a muchas moléculas del detergente, que desnaturaliza y da a la proteína una carga resultante negativa. Bajo estas circunstancias, todas las proteínas migran hacia el electrodo positivo —estando sus tasas de migración únicamente determinadas (como en el caso de los ácidos nucleicos) por el tamaño—. Tras la electroforesis las proteínas se transfieren a un filtro, que se incuba con los anticuerpos que reaccionan con la proteína de interés. El anticuerpo unido al filtro puede ser detectado de varias maneras, identificando de este modo la proteína contra la cual está dirigido el anticuerpo.

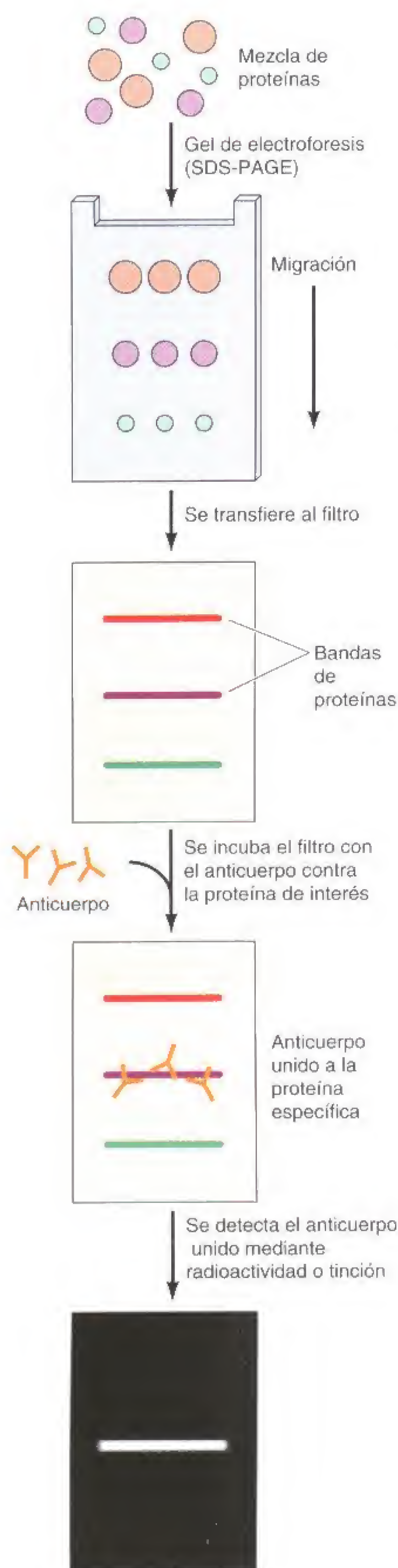



*Figura 3.29*
**Transferencia Western.** Se separan las proteínas según su tamaño por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se transfieren desde el gel a un filtro. Se incuba el filtro con un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. El anticuerpo unido al filtro se puede detectar mediante la reacción con varios agentes, como una sonda radioactiva que se une al anticuerpo.

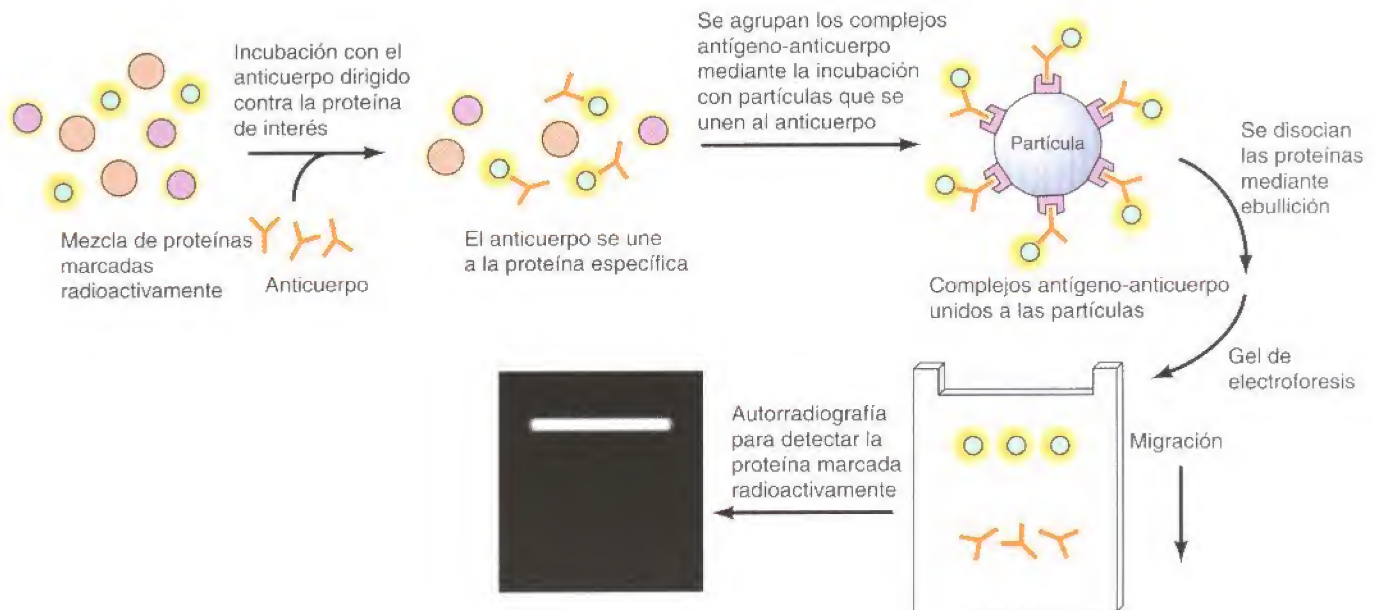



*Figura 3.30*
**Inmunoprecipitación.** Se incuban las proteínas marcadas radioactivamente con un anticuerpo, que forma complejos con la proteína contra la cual va dirigida (el antígeno). Estos complejos antígeno-anticuerpo se adhieren a partículas que se unen al anticuerpo. Se hierve el conjunto para disolver los complejos antígeno-anticuerpo, y se analizan las proteínas recuperadas con el gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida. Se detecta la proteína radioactiva que inmunoprecipitó mediante una autorradiografía.

En la inmunoprecipitación los anticuerpos son utilizados para aislar las proteínas contra las que reaccionan (Fig. 3.30). Las células son incubadas con aminoácidos radiactivos para marcar sus proteínas. Al extracto celular marcado se le añade un anticuerpo, que se une a su antígeno proteínico diana. Los complejos antígeno-anticuerpo resultantes se aislan y se someten a electroforesis, permitiendo la detección del antígeno radiactivo por autorradiografía.

Como fue expuesto en el Capítulo 1 los anticuerpos pueden ser utilizados para visualizar proteínas en el interior de las células, así como en células lisadas. Las células se tiñen con anticuerpos marcados con pigmentos fluorescentes, tras lo cual al ser examinados con el microscopio de fluorescencia se visualiza la localización subcelular de las proteínas antigénicas (véase Fig. 1.28). Los anticuerpos pueden ser etiquetados con marcadores visibles al microscopio electrónico, como metales pesados, permitiendo la visualización de antígenos a nivel ultraestructural.

## *Sondas de búsqueda en bibliotecas de ADN recombinante*

En la identificación de clones moleculares con ADN celular específico insertado se utilizan básicamente los mismos métodos que en la detección de ácidos nucleicos y proteínas en extractos celulares. Por ejemplo, se utiliza la hibridación de ácidos nucleicos para identificar clones genómicos o de ADNc que contengan secuencias de ADN para las que exista una sonda. El ADNc clonado en vectores de expresión puede también ser identificado con el uso de anticuerpos contra las proteínas que codifique.

El primer paso en el aislamiento de clones de genoma o de ADNc es frecuentemente la creación de una **biblioteca de ADN recombinante** —conjunto de clones que contienen todo el genoma o todas las secuencias de ARNm de un tipo celular (Fig. 3.33)—. Una **biblioteca genómica** humana, por ejemplo, se prepara clonando fragmentos al azar de ADN con un tamaño medio de 15 kb en un vector $\lambda$. Dado que el tamaño del genoma humano es aproximadamente de $3 \times 10^6$ kb, el ADN equivalente a un genoma estaría representado por unos 200.000 clones de $\lambda$. Sin embargo, dada la fluctuación estadística en el muestreo, muchos genes no estarían representados en una biblioteca de 200.000 clones recombinantes, mientras que otros genes estarían representados por varios clones. Por lo tanto es preferible crear bibliotecas de mayor tamaño, formadas por aproxi-

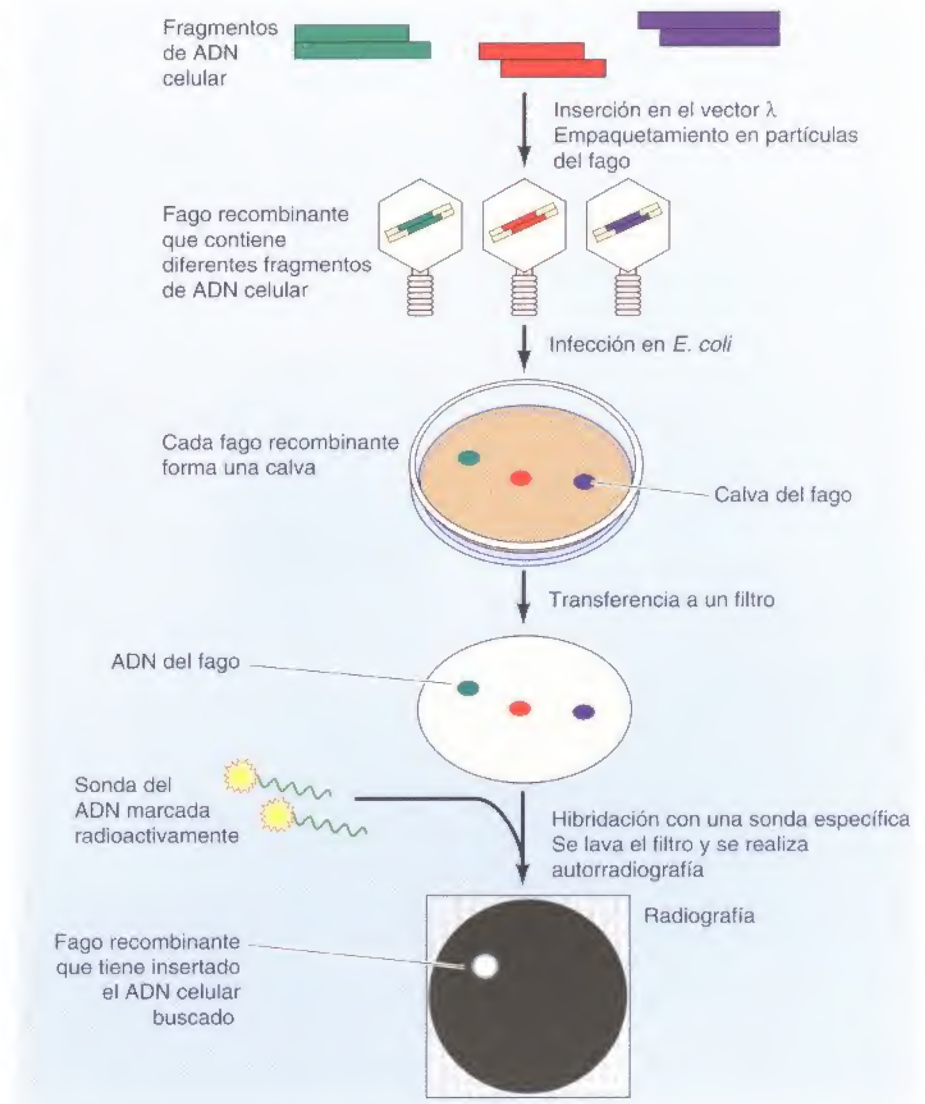



*Figura 3.31*
**Búsqueda por hibridación en una biblioteca recombinante.** Los fragmentos de ADN celular son clonados en un vector bacteriófago λ y son empaquetados en partículas del fago, obteniéndose una serie de fagos recombinantes que contienen diferentes ADNs celulares insertados. Los fagos infectan bacterias, y el cultivo se cubre con un filtro. Algunos de los fagos de cada calva se transfieren al filtro, que entonces se hibrida con una sonda marcada radioactivamente para identificar la placa de fagos que contiene el gen buscado. En ese momento se puede aislar la calva de fagos dentro del cultivo original.

madamente 1 millón de fagos recombinantes, para asegurarse una alta probabilidad de que cualquier gen de interés esté representado.

Cualquier gen puede ser aislado con facilidad a partir de dicha biblioteca recombinante siempre que exista la sonda correspondiente. Los fagos recombinantes se siembran en un cultivo de *E.coli* donde cada fago se replica y produce una calva en la extensión de bacterias. Las calvas se transfieren a filtros de un modo similar a como se pasa el ADN del gel al filtro durante la transferencia Southern, y los filtros son hibridados con una sonda marcada para identificar la calva del fago que contiene el gen buscado. Puede entonces aislarse la calva apropiada de la placa original con el fin de propagar el fago recombinante que porta el gen buscado. Existen procedimientos similares para explorar colonias bacterianas portadoras de clones de ADN plasmídicos, por lo que es posible aislar clones específicos por hibridación a partir de bibliotecas de fagos y de plásmidos.

En la exploración de bibliotecas recombinantes se emplean varios tipos de sondas. Por ejemplo, se puede utilizar un ADNc como sonda para aislar el clon genómico correspondiente, o un gen clonado de una especie (p. ej., ratón) puede usarse para aislar un gen relacionado de otra especie (p. ej., humano). Ade-

más de emplear fragmentos de ADN clonado, es posible sintetizar oligonucleótidos (de entre 15 y 20 bases) que sirvan como sondas, permitiendo el aislamiento de genes basándose en el uso de secuencias aminoacídicas parciales de las proteínas que codifican. Estos oligonucleótidos se utilizan como sondas para aislar clones de ADNc, que (como fue discutido previamente) son mucho más fáciles de secuenciar y caracterizar que la proteína misma. Es por lo tanto posible proceder experimentalmente al aislamiento de un gen partiendo de una secuencia peptídica parcial.

El uso de sondas de anticuerpos para explorar bibliotecas de expresión es un abordaje alternativo en el aislamiento de un gen basándose en su producto proteínico. En este caso se genera una **biblioteca de ADNc** en un vector de expresión que dirige la síntesis proteínica en *E. coli*. Las colonias bacterianas o las calvas de los fagos son transferidas a un filtro del modo previamente descrito, pero se hace reaccionar con un anticuerpo (como en la transferencia Western) para identificar los clones que están produciendo la proteína buscada.

Estos procedimientos para la identificación de clones moleculares y la detección de genes y productos génicos celulares ilustran la flexibilidad de la tecnología del ADN recombinante. Partiendo de cualquier gen clonado, es posible no solo determinar su secuencia nucleotídica y utilizarlo como sonda para estudios de organización y transcripción génica, sino también expresarlo y desarrollar el antisuero contra la proteína que codifica. Y, a la inversa, es posible clonar genes basándose en la caracterización de la proteína de interés, utilizando oligonucleótidos o sondas de anticuerpos. El ADN recombinante ha permitido progesar experimentalmente bien desde el ADN a la proteína o bien desde la proteína al ADN, proporcionando una gran versatilidad a las estrategias actualmente empleadas para el estudio de los genes en eucariotas y las proteínas que codifican.

## Función de los genes en eucariotas

Las técnicas de ADN recombinante descritas en las secciones previas proporcionan poderosas herramientas para el aislamiento y caracterización detallada de los genes de las células eucarióticas. Sin embargo para entender la función de un gen es necesario analizarlo formando parte de la célula o de un organismo intacto —no simplemente como un clon molecular en una bacteria. En la genética clásica la función de los genes ha sido puesta de manifiesto por las alteraciones en el fenotipo de los organismos mutados. La llegada del ADN recombinante ha añadido una nueva dimensión a los estudios sobre la función de los genes, dado que ha hecho posible investigar la función de un gen de forma directa reintroduciéndo el ADN clonado en una célula eucariótica. En organismos eucarióticos más simples, como las levaduras, esta técnica ha permitido el aislamiento de clones moleculares de virtualmente cualquier gen mutado. Existen diversos métodos para introducir genes clonados en células animales y vegetales en cultivo, así como en organismos intactos, con el fin de realizar análisis funcionales. Estos avances se pueden complementar con la posibilidad de introducir mutaciones en el ADN clonado *in vitro*, aplicando el poder de las técnicas de ADN recombinante a los estudios funcionales de los genes pertenecientes a eucariotas más complejos.

### *Análisis genético en levaduras*

Las levaduras son particularmente ventajosas para los estudios de biología molecular en eucariotas (véase Cap. 1). El genoma de la *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene $1{,}2 \times 10^7$ pares de bases, es 200 veces más pequeño que el genoma humano. Además las levaduras se cultivan con facilidad, reproduciéndose con un tiempo de división de unas 2 horas. Por lo tanto ofrecen las mismas ventajas básicas —un genoma pequeño y reproducción rápida— que las proporcionadas por las bacterias.

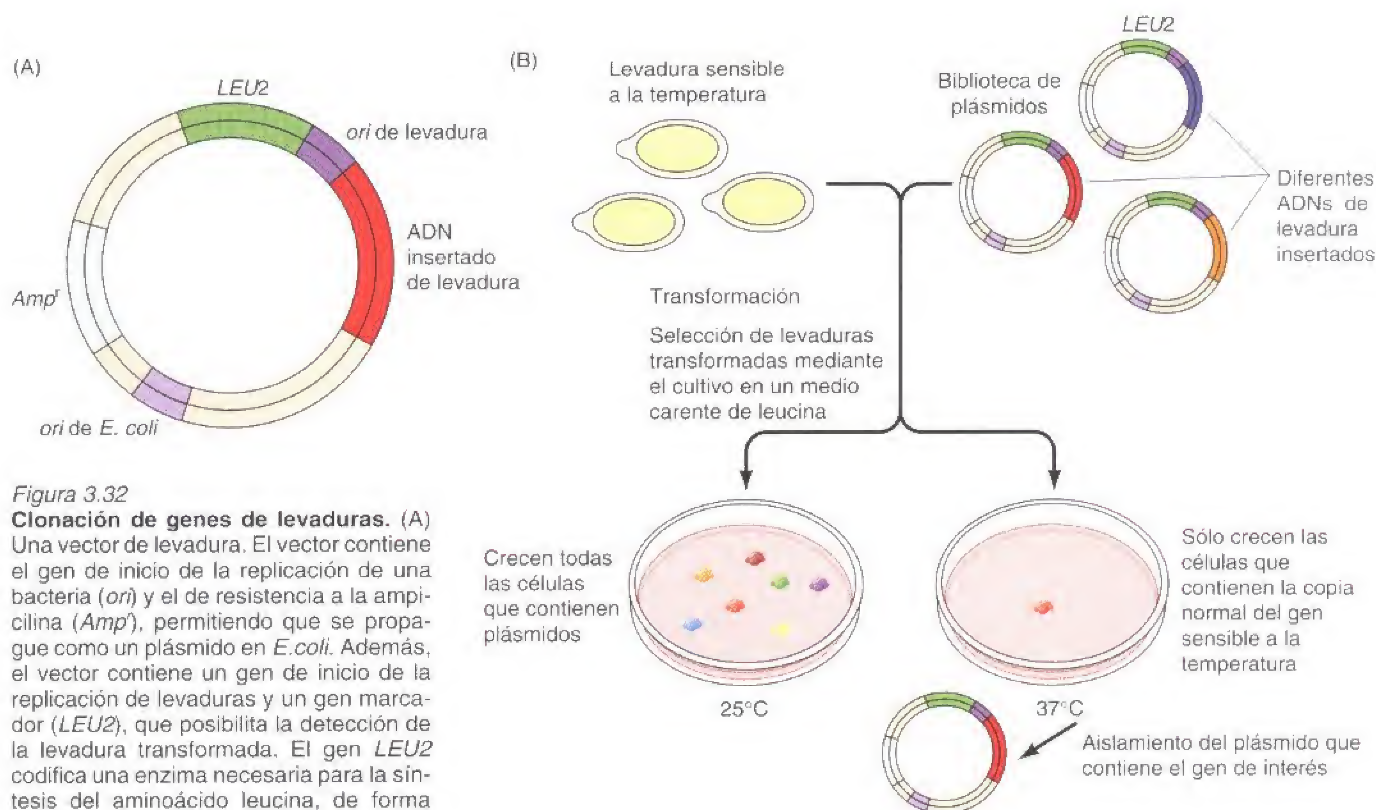



*Figura 3.32*
**Clonación de genes de levaduras.** (A) Una vector de levadura. El vector contiene el gen de inicio de la replicación de una bacteria (*ori*) y el de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*), permitiendo que se propague como un plásmido en *E.coli*. Además, el vector contiene un gen de inicio de la replicación de levaduras y un gen marcador (*LEU2*), que posibilita la detección de la levadura transformada. El gen *LEU2* codifica una enzima necesaria para la síntesis del aminoácido leucina, de forma que las cepas de levaduras transformadas, que originalmente carecen de esta enzima, pueden detectarse al cultivarse y crecer en un medio sin leucina. (B) Aislamiento de un gen de levadura. Se identifica un gen de interés mediante una mutación sensible a la temperatura, que consiste en que la levadura crezca a 25 °C pero no a 37 °C. Para aislar un clon de este gen se transforman las levaduras sensibles a la temperatura con una biblioteca de plásmidos que contenga una serie de genes que abarquen todo el genoma de las levaduras. Toda levadura transformada por el ADN del plásmido es capaz de crecer en un medio carente de leucina a 25 °C, pero sólo aquellas transformadas por un plásmido que contenga la copia normal del gen de interés son capaces de crecer a una temperatura de 37 °C. Puede aislarse el plásmido deseado a partir de las levaduras transformadas que forman colonias a la temperatura no permisiva.

Las mutaciones en las levaduras son tan fácilmente identificables como en *E. coli*. Es sencillo, por ejemplo, aislar una levadura mutante que precise un aminoácido u otro nutriente en particular para crecer. Es posible además aislar levaduras con defectos en genes necesarios para procesos celulares fundamentales (en contraste con los defectos metabólicos) en forma de **mutantes con sensibilidad térmica o termosensibles**. Dichos mutantes codifican proteínas que son funcionales a una determinada temperatura (la temperatura permisiva) pero no a otra (la temperatura no permisiva), mientras que las proteínas normales son funcionales a ambas temperaturas. Una levadura con una mutación con sensibilidad térmica en un gen esencial puede ser identificada por ser únicamente capaz de crecer a la temperatura permisiva. La posibilidad de aislar estos mutantes termo-sensibles ha permitido la identificación de los genes de la levadura que controlan muchos procesos celulares fundamentales, como la síntesis y procesamiento del ARN, la progresión a través del ciclo celular y el transporte de proteínas entre compartimentos celulares.

El relativamente simple sistema genético de las levaduras también permite la clonación de cualquier gen mutado, simplemente basándose en su actividad funcional (Fig. 3.32). En primer lugar se crea una biblioteca genómica de ADN normal de levadura en vectores que se replican como plásmidos en las levaduras de igual forma que en *E.coli*. El pequeño tamaño del genoma de la levadura implica que una biblioteca completa consta de unos pocos miles de plásmidos. Se emplea una mezcla de estos plásmidos para transformar una levadura mutada termosensible, y las cepas que son capaces de crecer a la temperatura no permisiva son seleccionadas. Dichas cepas transformadas han adquirido una copia normal del gen buscado en el ADN plasmídico, que puede ser entonces aislado con facilidad para su caracterización posterior a partir de las levaduras transformadas.

De este modo se han identificado los genes de levadura que codifican una amplia variedad de proteínas esenciales. Dichos genes aislados en levaduras han servido en muchos casos para identificar y clonar genes relacionados en

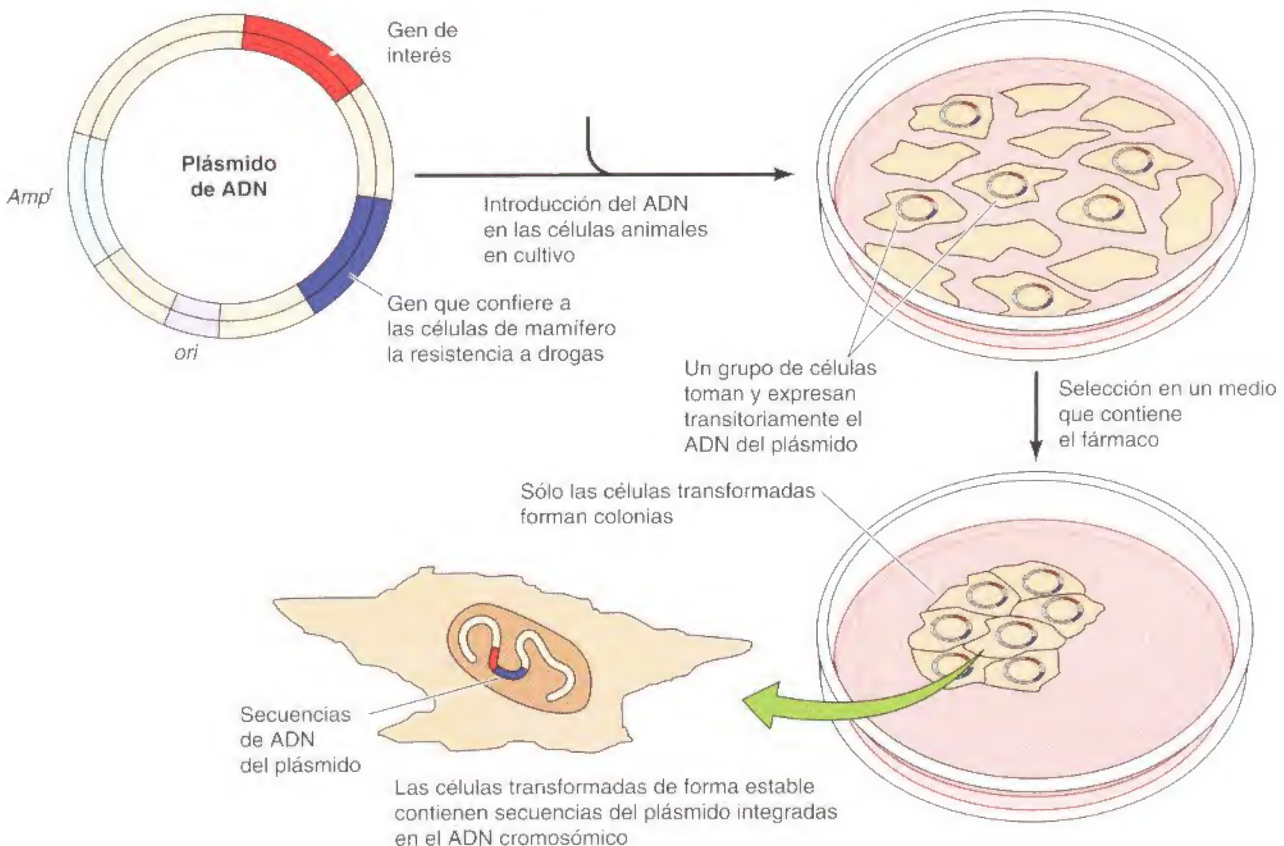
células de mamíferos. Por lo tanto, la sencilla estructura genética de las levaduras no sólo ha proporcionado un importante modelo para las células eucarióticas, sino que ha llevado directamente a la clonación de genes relacionados de eucariotas más complejos.

## *Transferencia de genes en plantas y animales*

Pese a que las células de eucariotas complejos no son susceptibles de ser manipuladas genéticamente de forma tan sencilla como las levaduras, la función de los genes puede ser investigada con la introducción de ADN clonado en células de plantas y animales. Dichos experimentos (denominados de forma general **transferencia génica**) han sido de una importancia crítica para aclarar una serie de cuestiones, como los mecanismos que regulan la expresión de los genes y el procesamiento de las proteínas. Como será expuesto más adelante, la transferencia génica ha permitido la identificación y caracterización de genes que controlan el crecimiento y diferenciación de las células animales, incluyendo un cierto número de genes que son responsables del crecimiento anormal de las células neoplásicas humanas.

La metodología para la introducción de ADN en células animales fue desarrollada inicialmente para ADN víricos infecciosos y, por tanto, a menudo se denomina **transfección** (una palabra derivada de *trans*formación + in*fección*) (Fig. 3.33). El ADN puede introducirse en células animales en cultivo mediante una variedad de métodos, incluyendo la microinyección directa en el núcleo celular, coprecipitación de ADN con fosfato cálcico para formar pequeñas partículas que serán internalizadas por las células, incorporación del ADN en vesículas lipídicas (**liposomas**) que se fusionan con la membrana plasmática, y exposición de las células a un breve pulso eléctrico que abre, de forma transitoria, poros en la membrana plasmática (**electroporación**). El ADN internalizado

*Figura 3.33*
**Introducción de ADN en células animales.** Un gen eucariótico de interés es clonado en un plásmido que contiene un marcador de resistencia a un fármaco, el cual puede seleccionar las células animales en cultivo. Se introduce el ADN del plásmido en células cultivadas como un coprecipitado de calcio y fosfato, que es captado y expresado por un grupo de células durante unos días (expresión transitoria). Las células transformadas de forma estable, en las que el ADN del plásmido se integra en el ADN cromosómico, pueden seleccionarse por su capacidad de crecer en un medio que contenga el fármaco.



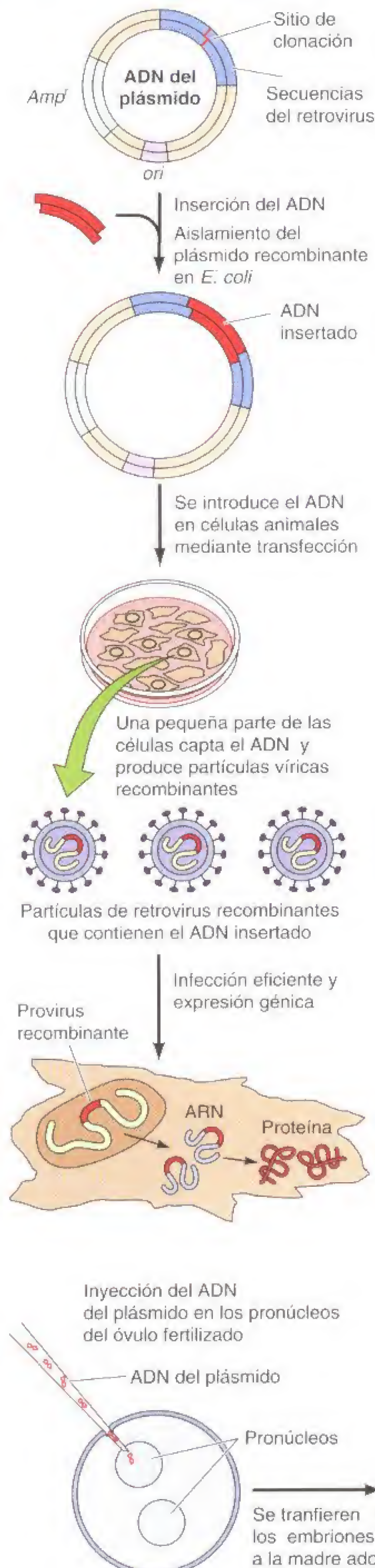



*Figura 3.34*
**Vectores retrovirales.** El vector se compone de secuencias retrovirales clonadas en un plásmido que puede propagarse en *E.coli.* El ADN extraño se inserta en las secuencias virales, y los plásmidos recombinantes pueden ser aislados a partir de las bacterias. En este momento se produce la transfección con el ADN recombinante de las células animales en cultivo. El ADN es captado por una pequeña parte de las células, que producen retrovirus recombinantes, los cuales contienen el ADN insertado. Estos retrovirus recombinantes pueden ser utilizados para infectar de manera eficaz nuevas células, donde el genoma viral con los genes insertados se integra en el ADN cromosómico en forma de provirus.

por una proporción elevada de las células es transportado al núcleo, donde puede transcribirse durante varios días —un fenómeno denominado **expresión transitoria**. En una proporción inferior de las células (generalmente un 1% o menos), el ADN extraño se integra de forma estable en el genoma de la célula y se transfiere a la progenie durante la división celular como cualquier otro gen de la célula. Estas células transformadas establemente pueden aislarse si el ADN transfectado contiene un marcador selectivo, como la resistencia a una droga que inhibe el crecimiento de las células normales. Así, cualquier gen clonado puede ser introducido en una célula mamífera transfiriéndolo junto a un marcador de resistencia a una droga que puede emplearse para aislar los transformantes estables. Los efectos de genes clonados de este modo sobre el comportamiento celular —por ejemplo, crecimiento o diferenciación celular— pueden entonces analizarse.

Los virus animales también pueden emplearse como vectores para la introducción más eficaz de ADN clonado en células. Los retrovirus son especialmente útiles en este sentido, ya que su ciclo de vida incluye una integración estable del ADN vírico en el genoma de la célula infectada (Fig. 3.34). Como consecuencia, los vectores retrovirales pueden emplearse para introducir eficazmente genes clonados en una variedad de tipos celulares, convirtiéndolos en un vehículo importante para una amplia gama de aplicaciones.

Es también posible introducir genes clonados en la línea germinal de un organismo multicelular, posibilitando su estudio en el contexto de un animal intacto en lugar de en células en cultivo. Por medio de la inyección del ADN clonado en el pronúcleo de un óvulo fertilizado se producen ratones que portan dichos genes extraños (**ratones transgénicos**) (Fig. 3.35). Los óvulos inyectados se implantan en madres adoptivas y se permite su desarrollo. En una parte de la progenie (aproximadamente el 10%) el ADN extraño se habrá integrado en el genoma del óvulo fertilizado y está por lo tanto presente en todas las células del animal. Dado que el ADN extraño está presente en las células germinales de igual forma que lo está en las somáticas, al reproducirse dicho ADN se

*Figura 3.35*
**Producción de ratones transgénicos.** El ADN es inyectado en pronúcleos de un óvulo de ratón fertilizado (los óvulos fertilizados contienen dos pronúcleos, uno del óvulo y otro del esperma). Los óvulos inyectados se transfieren a las madres adoptivas y se permite su desarrollo. Algunos de los descendientes (transgénicos) tienen incorporado en su genoma el ADN inyectado.

transmite a su descendencia como el resto de los genes celulares.

Las propiedades de las **células madre embrionarias** (**CME**) aportan un medio alternativo para introducir genes clonados en ratones (Fig. 3.36). Las CME pueden obtenerse a partir de embriones tempranos de ratón. Pueden ser reintroducidos en dichos embriones tempranos, donde participan de forma normal en el desarrollo y dan lugar a células en todos los tejidos del ratón - incluidas las células germinales. Es posible introducir ADN clonado en las CME en cultivo, seleccionar células transformadas de forma estable y reintroducirlas en embriones de ratón. Dichos embriones dan lugar a una descendencia quimérica en la que algunas células derivan de las células embrionarias normales y otras de las CME transfectadas. En algunos de estos ratones las CME transfectadas se incorporan a la línea germinal. Con la reproducción de estos ratones se consigue que su progenie herede de forma directa el gen transfectado.

También es posible introducir ADN clonado en células vegetales. Una posibilidad es eliminar la pared celular, dando lugar a protoplastos rodeados únicamente por una membrana plasmática. El ADN es introducido en los protoplastos por electroporación, de igual forma que en células animales. Alternativamente, se puede introducir ADN en células vegetales intactas bombardeándolas con microproyectiles (por ejemplo pequeñas partículas de tungsteno) cubiertos de ADN. Las partículas cubiertas de ADN se disparan directamente contra las células vegetales; algunas de las células mueren, pero otras sobreviven y se transforman de forma estable.

A partir de virus vegetales se han desarrollado vectores más eficientes para la introducción de ADN recombinante en células vegetales. Otro vehículo de reciente desarrollo para la introducción de ADN clonado en plantas es un plásmido de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (el **plásmido Ti**) (Fig. 3.37).

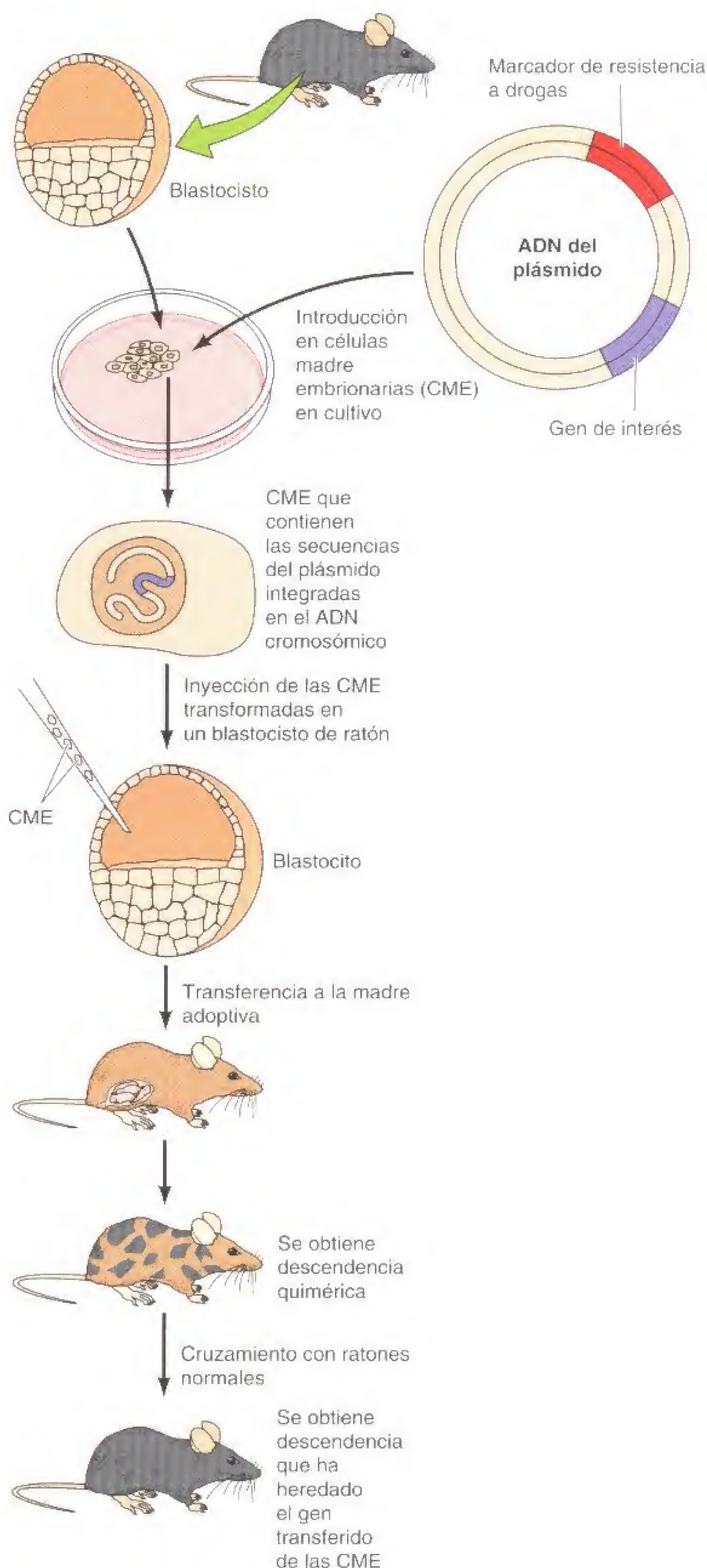



*Figura 3.36*
**Introducción de genes en ratones a través de células madre embrionarias.** Las células madre embrionarias son células cultivadas que proceden de embriones tempranos de ratón (blastocistos). El ADN es introducido en estas células en cultivo, y posteriormente se aíslan las células madre embrionarias transformadas de forma estable. Se inyectan estas células en un blastocisto receptor, donde son capaces de participar en el desarrollo normal del embrión. Algunos de los ratones hijos que se desarrollan tras la inyección de embriones en madres adoptivas contienen tanto células derivadas de las células madre embrionarias transformadas como células normales del blastocisto. Como estos ratones son mezcla de dos tipos de células diferentes se les denomina quiméricos. Pueden obtenerse descendientes que contengan el gen transfectado cruzando ratones quiméricos, cuyos descendientes tendrán las células madre embrionarias transformadas incorporadas en la estirpe germinal.

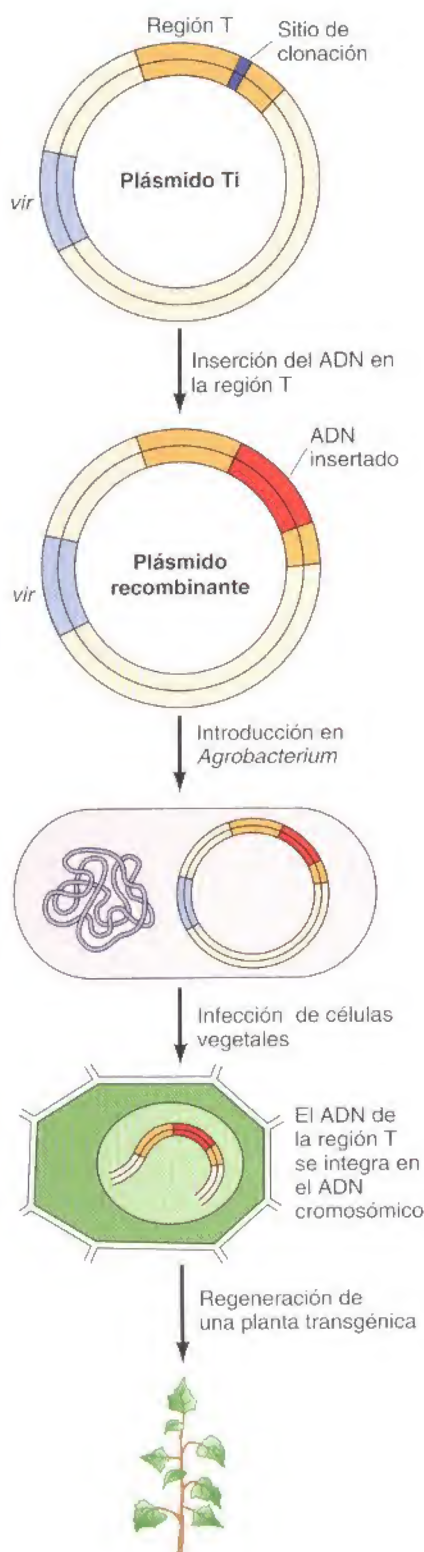



*Figura 3.37*
**Introducción de genes en células vegetales por medio del plásmido Ti.** El plásmido Ti contiene la región T, que se transfiere a células vegetales infectadas, y los genes de virulencia (*vir*), que actúan en la transferencia del ADN de la región T. En los vectores plasmídicos Ti, el ADN extraño se inserta en la región T. El plásmido recombinante se introduce en *Agrobacterium tumefaciens*, que se utiliza para infectar células en cultivo. La región T del plásmido (portadora del ADN insertado) es transferida a las células vegetales y se integra en el ADN cromosómico. Puede generarse una planta transgénica a partir de estas células transformadas.

En la naturaleza *Agrobacterium* se une a las hojas de las plantas y el plásmido Ti se transfiere a las células vegetales, donde se incorpora al ADN cromosómico. Los vectores desarrollados a partir del plásmido Ti proporcionan un medio eficiente para la introducción de ADN recombinante en células vegetales susceptibles. Dado que muchos tipos de plantas pueden regenerarse a partir de una única célula cultivada (véase Cap. 1), las plantas transgénicas se obtienen directamente de células en las que se introduce el ADN recombinante en cultivo —un procedimiento mucho más sencillo que la obtención de animales transgénicos—.

## Mutagénesis de ADN clonados

En los estudios genéticos clásicos (p. ej., en bacterias o levaduras), la clave para identificar los genes y entender su función es la observación del fenotipo alterado de los organismos mutantes. En dichos estudios los genes mutantes son detectados porque producen cambios fenotípicos observables —como por ejemplo crecimiento termosensible o requerimientos nutricionales específicos—. Sin embargo, el aislamiento de genes por técnicas de ADN recombinante ha permitido un enfoque diferente de la mutagénesis. Ahora es posible introducir la alteración que se desee en un gen clonado y determinar el efecto de la mutación en función de los genes. Dichos procedimientos han sido denominados **genética inversa**, dado que en primer lugar se introduce una mutación en un gen y posteriormente se determina su consecuencia. La capacidad de introducir mutaciones específicas en ADNs clonados (**mutagénesis *in vitro***) ha demostrado ser una poderosa herramienta en el estudio de la expresión y función de los genes eucarióticos.

Existen muchos procedimientos de mutagénesis *in vitro* para alterar genes clonados, que permiten la introducción de deleciones, inserciones o alteraciones de nucleótidos únicos. Un método habitual de mutagénesis es el uso de oligonucleótidos sintéticos para generar cambios de nucleótidos en una secuencia de ADN (Fig. 3.38). En este procedimiento se emplea un oligonucleótido sintético que porta la base mutante como cebador para la síntesis de ADN. Las moléculas de ADN de nueva síntesis que contienen la mutación pueden, a continuación, ser aisladas y caracterizadas. Por ejemplo, pueden modificarse aminoácidos específicos de una proteína para poder caracterizar su papel en la función proteica.

Modificaciones de esta técnica, combinadas con la versatilidad de otros métodos de manipulación de moléculas de ADN recombinante, pueden ser empleadas para introducir prácticamente cualquier modificación deseada en un gen clonado. Así, el efecto de dichas mutaciones sobre la expresión y función génica puede ser determinado a continuación, mediante la introducción del gen en el tipo celular apropiado. La mutagénesis *in vitro* ha permitido la caracterización en detalle del papel funcional tanto de las secuencias reguladoras como de las codificantes para proteínas de los genes clonados.

## Introducción de mutaciones en genes celulares

Pese a que la transferencia de genes clonados dentro de las células (particularmente en combinación con mutagénesis *in vitro*) proporciona una poderosa herramienta en el estudio de la estructura y función génica, dichos experimentos no son capaces de definir la función de un gen desconocido en una célula u

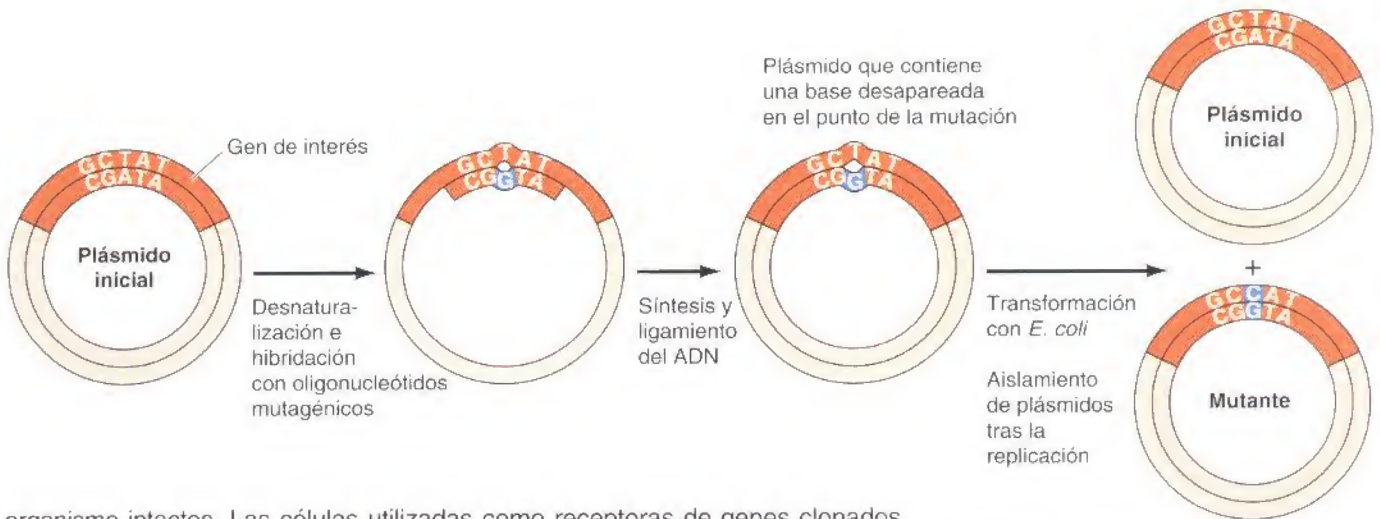



*Figura 3.38*
**Mutagénesis con oligonucleótidos sintéticos.** Un oligonucleótido portador de la alteración deseada en una base se utiliza como cebador en la síntesis de ADN a partir de un plásmido de ADN, produciendo un ADN circular mediante la incubación con ADN ligasa. Con este proceso se obtienen plásmidos en los cuales una cadena contiene la base normal y la otra cadena contiene la base mutada. La replicación de los plásmidos de ADN tras la transformación de *E. coli* produce por tanto una mezcla de plásmidos normales y mutantes.

organismo intactos. Las células utilizadas como receptoras de genes clonados poseen copias normales de estos genes en su ADN cromosómico, y estas copias normales continúan realizando sus funciones en las células. Es preciso eliminar la actividad de las copias normales de un gen para determinar su papel biológico. Como veremos más adelante, en levaduras se puede conseguir de forma sencilla. En células de mamífero esta tarea es considerablemente más compleja, pese a lo cual tenemos a nuestra disposición distintos métodos para inactivar las copias cromosómicas del gen clonado o inhibiendo la función génica normal, actualmente son muy utilizados.

La introducción de mutaciones en los genes cromosómicos de las levaduras es una tarea relativamente sencilla porque el ADN introducido frecuentemente se somete a **recombinación homóloga** con la copia cromosómica normal del gen (Fig. 3.39). En la recombinación homóloga el gen clonado reemplaza al alelo

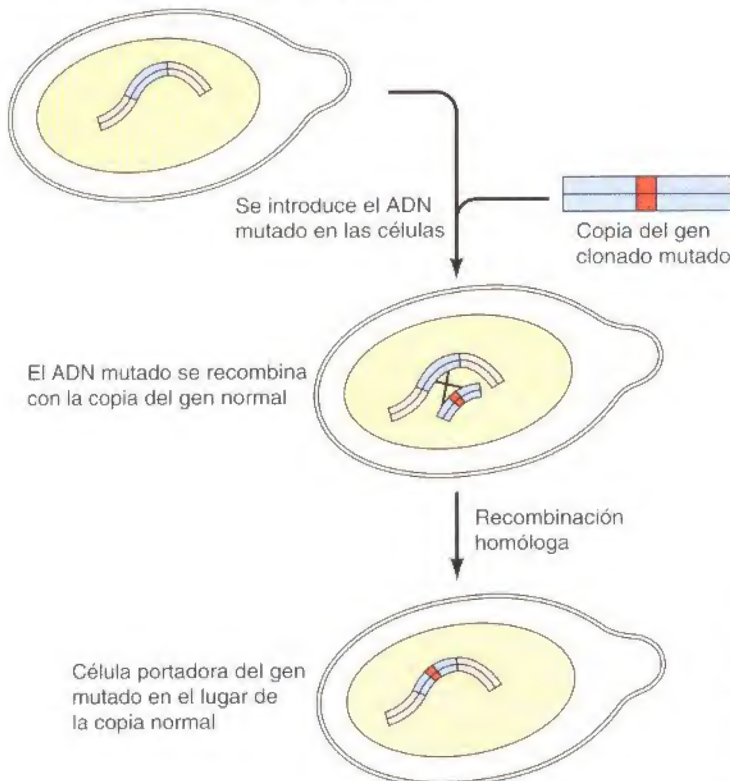



*Figura 3.39*
**Inactivación génica mediante recombinación homóloga.** Una copia mutada del gen clonado es introducida dentro de las células. El gen clonado puede sustituir a la copia del gen normal por recombinación homóloga, obteniéndose una célula que transporta la mutación deseada en su ADN cromosómico.

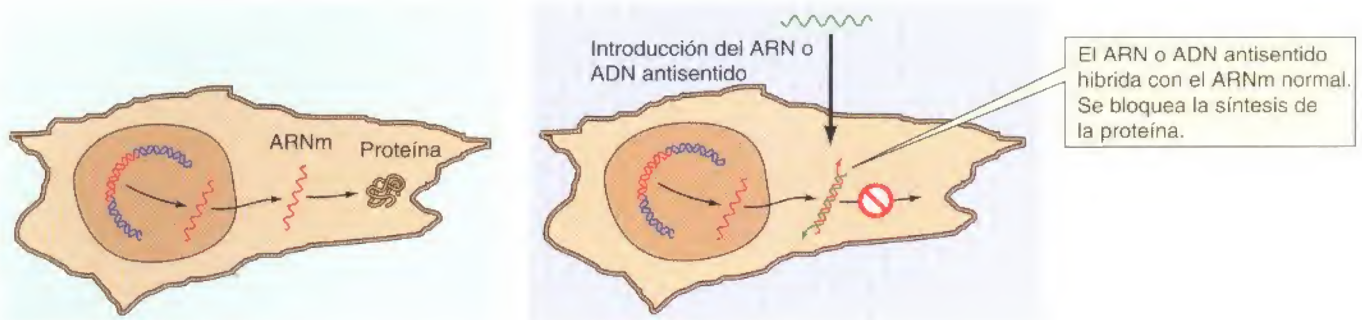



*Figura 3.40*
**Inhibición de la expresión génica mediante ARN o ADN antisentido.** El ARN o el ADN de cadena única antisentido son complementarios al ARNm de un gen de interés. Los ácidos nucleicos antisentido forman por tanto híbridos con los ARNm diana, bloqueando la traducción del ARNm a proteína.

normal, por lo que las mutaciones introducidas *in vitro* se incorporan a la copia cromosómica del gen de la levadura. En el supuesto más simple, en lugar del gen normal se introduce un gen inactivado por medio de una mutación con el fin de determinar su papel en los procesos celulares. Dado que las levaduras pasan a lo largo de su ciclo vital por etapas haploides y diploides, es incluso posible inactivar y estudiar genes necesarios para el crecimiento celular. Una copia inactiva del gen se introduce en una célula diploide, que en adelante posee una copia activa y otra inactiva del gen de interés. Las células son inducidas a entrar en meiosis, pudiéndose observar el efecto de la inactivación del gen en la progenie haploide.

En células animales la recombinación entre el ADN transferido y su gen homólogo es un hecho poco frecuente, por lo que la inactivación de genes por este método es más difícil que en levaduras. Probablemente a causa del mayor tamaño de los genomas de las células de mamífero, la mayor parte del ADN transfectado se integra en el genoma receptor en sitios al azar por recombinación con secuencias no relacionadas. Sin embargo, ha sido posible desarrollar métodos para seleccionar y aislar las células transformadas en las cuales se ha producido recombinación homóloga, por lo que se pueden inactivar genes en células animales por este procedimiento. Y lo que es más importante, es factible inactivar genes no sólo en líneas celulares somáticas, sino también en células madre embrionarias (CME) en cultivo. A partir de las CME es posible generar ratones transgénicos y por lo tanto investigar los efectos de la inactivación de un gen en un animal intacto. Las funciones de centenares de genes de ratón han sido investigadas de este modo, siendo de especial interés los hallazgos acerca del papel de genes específicos en el desarrollo.

Una alternativa a la inactivación de genes por recombinación homóloga es el uso de **ácidos nucleicos antisentido** para bloquear la expresión génica (Fig. 3.40). Se introduce en la célula ARN o ADN de cadena simple complementario al ARNm del gen de interés (antisentido). El ARN o ADN antisentido hibrida con el ARNm y bloquea su traducción a proteína. Los híbridos ADN-ARN resultantes de la introducción de ADN antisentido habitualmente son degradados en el interior de la célula. El ARN antisentido se introduce de forma directa en la célula por inyección con micropipetas, aunque es posible emplear vectores desarrollados para expresar dicho ARN. El ADN antisentido está formado generalmente por oligonucleótidos cortos (de unas 20 bases) que puede ser inyectado en las células. De forma alternativa, y dado que las células son capaces de captar oligonucleótidos del medio de cultivo, éstos pueden ser añadidos directamente al medio celular.

La **interferencia de ARN (ARNi)** proporciona un método adicional, y muy eficaz, para interferir con la expresión génica a nivel del ARNm (Fig. 3.41). En la interferencia de ARN, moléculas cortas de ARN de doble hebra (21 a 23 nucleótidos) inducen la degradación de los ARNm complementarios. Aunque el mecanismo por el que los RNA cortos de doble hebra inducen la degradación de su

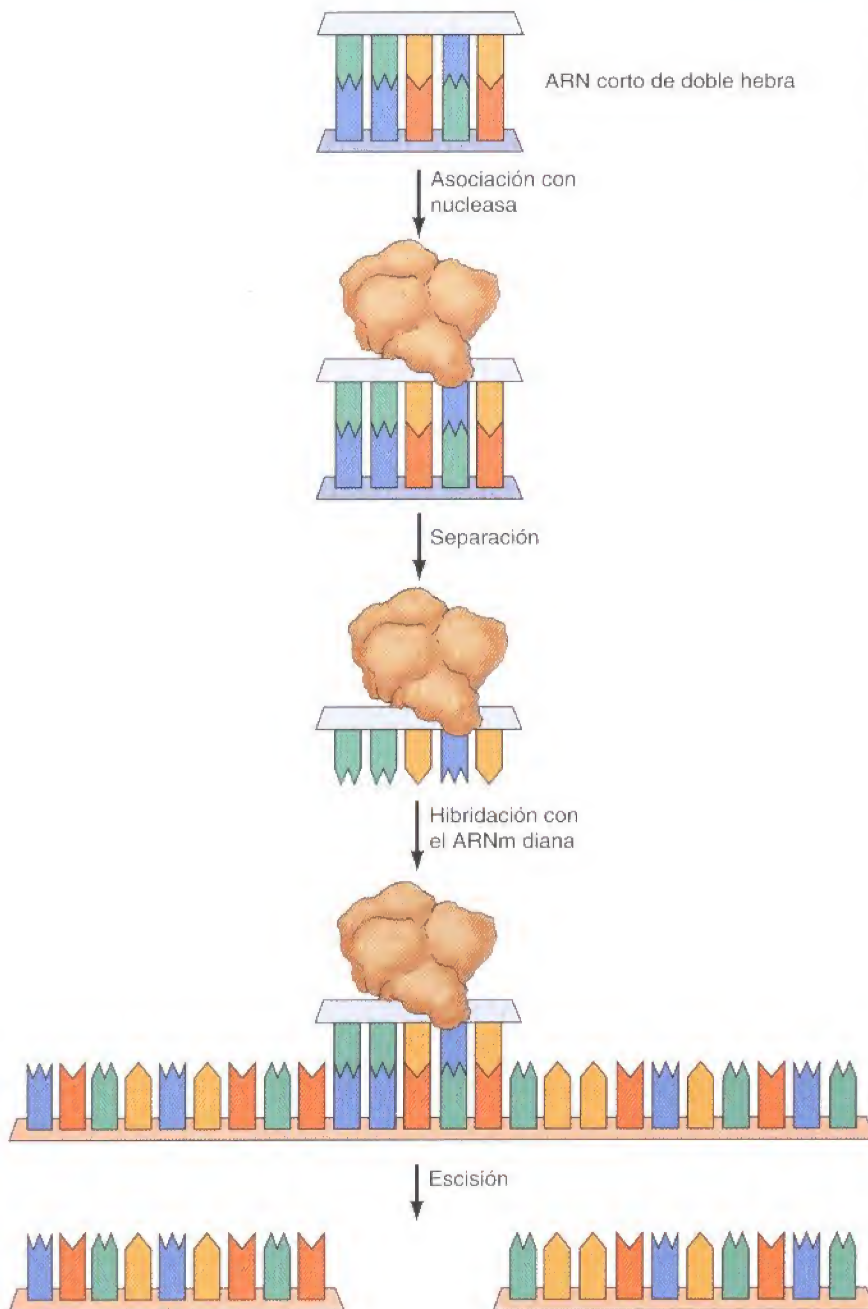



*Figura 3.41*
**Interferencia de ARN.** Moléculas cortas de ARN de doble hebra se asocian con una ribonucleasa proteica. La separación de las dos hebras del ARN y su hibridación con un ARNm homólogo dirige la nucleasa al ARNm, desencadenando la escisión de este último.

ARNm diana no se comprende totalmente, parece implicar la actividad de una ribonucleasa que se asocia con los ARN de doble hebra y es guiada al ARNm diana mediante el apareamiento de bases complementarias. En un principio se observó que el ARNi inducía una degradación eficaz del ARNm en *C. elegans*, y su uso se ha extendido a *Drosophila*, *Arabidopsis* y, más recientemente a células de mamífero.

Además de inactivar un gen o inducir la degradación de un RNAm, en ocasiones es posible interferir directamente con la función de las proteínas en el interior de las células (Fig. 3.42). Una posibilidad es inyectar anticuerpos que bloqueen la actividad de la proteína contra la que van dirigidos. Un método alternativo es la utilización de proteínas mutantes que interfieren con la función

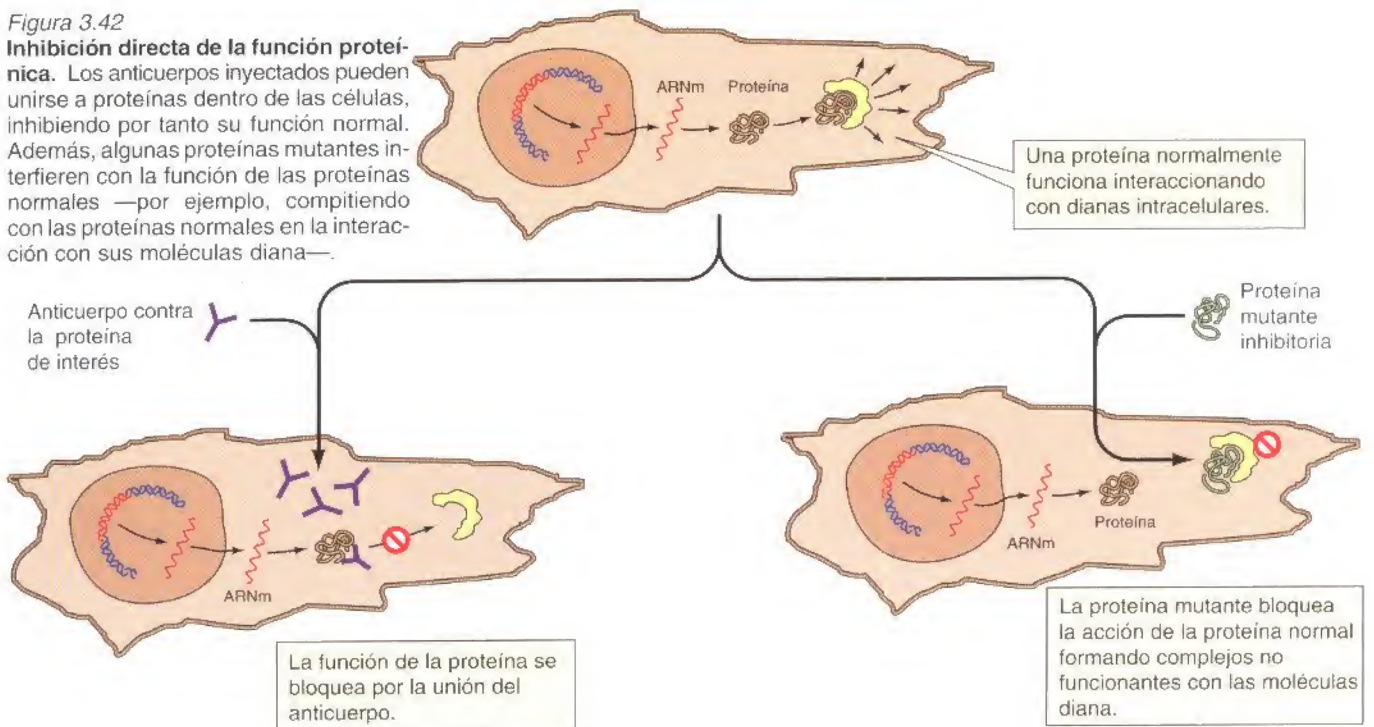



*Figura 3.42*
**Inhibición directa de la función proteínica.** Los anticuerpos inyectados pueden unirse a proteínas dentro de las células, inhibiendo por tanto su función normal. Además, algunas proteínas mutantes interfieren con la función de las proteínas normales —por ejemplo, compitiendo con las proteínas normales en la interacción con sus moléculas diana—.

de su homóloga normal cuando se expresan en la misma célula —por ejemplo, compitiendo por la unión a su molécula diana—. Se pueden introducir por transferencia génica ADNs clonados que codifiquen dichas proteínas (denominadas **mutantes inhibitorios dominantes**) para estudiar los efectos del bloqueo de genes normales.

| PALABRAS CLAVE | RESUMEN |
| --- | --- |
| | **HERENCIA, GENES Y ADN** |
| **gen, alelo, dominante, recesivo, genotipo, fenotipo, cromosoma, diploide, meiosis, haploide, mutación** | ***Genes y cromosomas***: Los cromosomas son los portadores de los genes. |
| **hipótesis de un gen-una enzima** | ***Genes y enzimas***: Un gen determina la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. |
| **transformación** | ***Identificación del ADN como material genético***: Se identificó el ADN como material genético gracias a experimentos de transformación bacteriana. |
| | ***Estructura del ADN***: El ADN es una doble hélice en la que se forman enlaces de hidrógeno entre las purinas y las pirimidinas de cadenas opuestas. Debido al apareamiento específico de bases —A con T y G con C— las dos cadenas de una molécula de ADN tienen una secuencia complementaria. |
| **replicación semiconservativa, ADN polimerasa** | ***Replicación del ADN***: El ADN se replica por un mecanismo semiconservativo, en el que las dos cadenas se separan y cada una sirve de modelo para la síntesis de una nueva cadena hija. |

## EXPRESIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

***Colinearidad entre genes y proteínas***: El orden de los nucleótidos en el ADN determina el orden de los aminoácidos en las proteínas.

***Papel del ARN mensajero***: El ARN mensajero funciona como intermediario en el transporte de la información desde el ADN hasta los ribosomas, donde se utiliza como molde en la síntesis de proteínas.

**dogma central, transcripción, traducción, ARN mensajero (ARNm), ARN polimerasa, ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt)**

***Código genético***: El ARN de transferencia o transferente se utiliza como adaptador entre los aminoácidos y el ARNm durante la síntesis proteínica. Cada aminoácido se especifica por un codón que consta de tres nucleótidos.

**código genético, traducción *in vitro*, codón**

***Virus ARN y transcripción inversa***: Se puede sintetizar el ADN a partir de moldes de ARN, como fue descubierto en los retrovirus en primer lugar.

**retrovirus, transcripción inversa, transcriptasa inversa**

## ADN RECOMBINANTE

***Endonucleasas de restricción***: Las endonucleasas de restricción cortan secuencias de ADN específicas, obteniéndose fragmentos definidos a partir de moléculas de ADN.

**endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, mapa de restricción**

***Generación de moléculas de ADN recombinante***: Las moléculas de ADN recombinante constan de un fragmento de ADN de interés ligado a un vector que es capaz de replicarse independientemente en una célula huésped apropiada.

**clonación molecular, vector, molécula recombinante, clon molecular, ligasa de ADN, ADNc**

***Vectores para ADN recombinante***: Se utilizan diversos vectores para clonar fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

**plásmido, origen de la replicación, cósmido, cromosoma artificial P1 (PAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura**

***Secuenciación del ADN***: La secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados se puede determinar fácilmente.

**didesoxinucleótido, autorradiografía**

***Expresión de los genes clonados***: Las proteínas codificadas por los genes clonados pueden expresarse a gran escala tanto en bacterias como en células eucariotas.

**vector de expresión, baculovirus**

***Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa***: la PCR permite la amplificación y el aislamiento de fragmentos específicos de ADN *in vitro*.

**reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

## DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

***Hibridación de ácidos nucleicos***: La hibridación de ácidos nucleicos permite detectar secuencias concretas de ADN o ARN.

**hibridación de ácidos nucleicos, sonda, transferencia Southern, transferencia Northern, microarrays de ADN, hibridación *in situ***

***Detección de pequeñas cantidades de ADN o ARN por PCR***: La PCR constituye un método sensible para detectar pequeñas cantidades de moléculas específicas de ADN o ARN.

***Anticuerpos como sondas para proteínas***: los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar proteínas específicas en células o extractos celulares.

**anticuerpo, antígeno, anticuerpo monoclonal, inmunotransferencia, transferencia Western, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

***Sondas para la búsqueda en bibliotecas de ADN recombinante***: Es posible detectar fragmentos específicos de ADN insertado en las bibliotecas de ADN recombinante por medio de la hibridación de ácidos nucleicos o de las sondas de anticuerpos.

**biblioteca de ADN recombinante, biblioteca genómica, biblioteca de ADNc**

## FUNCIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS

**mutante sensible a la temperatura**

***Análisis genético en levaduras***: La sencillez de su genética y la rápida replicación de las levaduras facilita la clonación molecular de cualquier gen que corresponda a una mutación de la levadura.

**transferencia génica, transfección, expresión transitoria, liposoma, electroporación, ratón transgénico, célula madre embrionaria (CME), plásmido Ti**

***Transferencia génica en plantas y animales***: Los genes clonados pueden ser introducidos en células eucariotas complejas y en organismos multicelulares para su análisis funcional.

**genética inversa, mutagénesis *in vitro***

***Mutagénesis de ADN clonado***: La mutagénesis *in vitro* del ADN clonado sirve para estudiar el efecto de las mutaciones en la función génica.

**recombinación homóloga, ácidos nucleicos antisentido, interferencia de ARN, mutante inhibitorio dominante**

***Introducción de mutaciones en genes celulares***: Pueden introducirse mutaciones en las copias de genes cromosómicos mediante la recombinación homóloga con secuencias de ADN clonado. Además, se puede bloquear la expresión o función de productos génicos específicos mediante ácidos nucleicos antisentido o con mutaciones inhibitorias dominantes.

## Preguntas

**1.** Define la traducción en el contexto de la biología molecular.

**2.** ¿Qué componentes deben estar presentes para poder hacer una síntesis proteica *in vitro*?

**3.** ¿Cómo se descubrió la primera correspondencia de un codon con un aminoácido?

**4.** ¿Qué significa decir que el código genético es degenerado?

**5.** La adición o deleción de uno o más nucleótidos en la parte codificante de un gen produce una proteína afuncional, mientras que la adición o deleción de tres nucleótidos a menudo produce una proteína con una función casi normal. Explícalo.

**6.** Describe las características que debe poseer un cromosoma artificial de levaduras para clonar un fragmento de ADN humano cortado con *Eco*R1 en levadura.

**7.** ¿Por qué resulta tan útil la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)?

**8.** ¿Qué diferencia existe entre una biblioteca genómica y una biblioteca de ADNc?

**9.** Está estudiando una enzima en la cual existe un residuo de cisteína activo que está codificado por el triplete UGU. ¿Cómo afectaría a la función enzimática la mutación de la tercera base por una C? ¿Y la mutación por una A?

**10.** La digestión de una molécula de ADN de 4 kb con *Eco*RI produce dos fragmentos de 1 kb y 3 kb cada uno. La digestión de la misma molécula con *Hind*III proporciona fragmentos de 1,5 kb y 2,5 kb. Por último, tras la digestión combinada con *Eco*RI y *Hind*III se obtienen fragmentos de 0,5 kb, 1 kb y 2,5 kb. Dibuje el mapa de restricción indicando la posición de los puntos de corte de *Eco*RI y *Hind*III.

**11.** Comenzando con ADN de un solo espermatozoide, ¿cuántas copias de una secuencia génica específica se conseguirán después de 10 ciclos de amplificación con PCR? ¿Y tras 30 ciclos?

**12.** Ha clonado un ADNc de función desconocida. ¿Cómo determinaría experimentalmente la localización subcelular de la proteína que codifica?

**13.** Está interesado en identificar los residuos de aminoácidos importantes para la actividad catalítica de una enzima. Asumiendo que dispone de un clon del ADNc, ¿qué estrategias experimentales emplearía?

## Bibliografía

### *Referencias generales*

Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford: Oxford Univ. Press.

Weaver, R. F. 2002. *Molecular Biology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.

### *Herencia, genes y ADN*

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137-158. [P]

Franklin, R. E. and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740-741. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503-1508. [P]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 44: 671-682. [P]

Watson, J.D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribo nucleic acid. *Nature* 171: 964-967. [P]

Watson, J.D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738-740. [P]

### *Expresión de la información genética*

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209-1211. [P]

Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576-581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and R. J. Watts-Tobin. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232. [P]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326-328. [P]

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588-1602. [P]

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213. [P]

Yanofsky, C., B. C. Carlton, J. R. Guest, D. R. Helinski and U. Henning. 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 266-272. [P]

### *ADN recombinante*

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience. [R]

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244. [P]

Nathans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273-293. [R]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. [P]

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467. [P]

### *Detección de ácidos nucleicos y proteínas*

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.

Benton, W. D. and R. W. Davis. 1977. Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196: 180-182. [P]

Broome, S. and W. Gilbert. 1978. Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2746-2749. [P]

Brown, P. O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 21: 33-37. [R]

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230: 281-285. [R]

Gerhold, D., T. Rushmore and C. T. Caskey. 1999. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci.* 24: 168 -173. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961-3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497. [P]

Maniatis, T., R. C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, G. K. Sim and A. Efstratiadis. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15: 687-701. [P]

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schildkraut, C. L., J. Marmur and P. Doty. 1961. The formation of hybrid DNA molecules, and their use in studies of DNA homologies. *J. Mol. Biol.* 3: 595-617. [P]

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517. [P]

### *Función génica en eucariotas*

Botstein, D. and D. Shortle. 1985. Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis. *Science* 229: 1193-1201. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155-27158. [R]

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292. [R]

Gasser, C. S. and R. T. Fraley. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244: 1293-1299. [R]

Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384. [P]

Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219-222. [R]

Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231. [P]

Hutvagner, G. and P. D. Zamore. 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232. [R]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007-1015. [P]

Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. *Science* 240: 1468-1474. [R]

Joyner, A. L., ed. 1993. *Gene Targeting. A Practical Approach*. Oxford, England: IRL Press.

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429. [P]

Maliga, P., D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner, eds. 1994. *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986.

Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465-499. [R]

Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn and M. Evans. 1986. Germline transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-448. [P]

Sedivy, J. M. 1999. Gene targeting and somatic cell genetics: A rebirth or a coming of age? *Trends Genet.* 15: 88-90. [R]

Sharp, P. A. 2001. RNA interference—2001. *Genes Dev.* 15: 485-490. [R]

Smith, M. 1985. *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423-462. [R]

Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-397. [R]

Thomas, K. R. and M. R. Capecchi, 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-512. [P]

Wagner, R. W. 1994. Gene inhibition using antisense oligonucleotides. *Nature* 372: 333-335. [R]

Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel. 1979. Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. *Cell* 16: 777-785. [P]

Sección **II**

# *Flujo de la información genética*



4 *Organización y secuenciación de los genomas celulares*

5 *Replicación, mantenimiento, y reorganización del ADN genómico*

6 *Síntesis y maduración del ARN*

7 *Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación*

# 4

# Organización y secuenciación de los genomas celulares



COMO MATERIAL GENÉTICO, EL ADN PROPORCIONA UN PATRÓN que dirige todas las actividades celulares y determina el plan de desarrollo de los organismos multicelulares. Por lo tanto, entender la estructura genética y su función resulta fundamental para obtener una visión de la biología molecular de las células. El desarrollo de la clonación de genes ha supuesto un gran paso hacia estos objetivos, permitiendo a los científicos diseccionar genomas eucariotas complejos y probar las funciones de los genes eucarióticos. Los continuados avances en la tecnología recombinante del ADN nos conducen hasta el inquietante momento de determinar las secuencias de genomas completos, acercándonos a descifrar las bases genéticas del comportamiento celular.

Tal y como se repasó en el Capítulo 3, las aplicaciones iniciales del ADN recombinante estuvieron dirigidas al aislamiento y análisis de genes individuales. Recientemente, se ha conseguido secuenciar genomas enteros —no sólo en bacterias y levaduras, sino también en los complejos genomas de plantas y animales, incluyendo a humanos—. En la actualidad se conocen secuencias génicas completas de diversas bacterias, levaduras y genomas animales prototípicos —los del nemátodo *C. elegans* y el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*—. También se han producidos progresos importantes en la determinación de la secuencia génica humana, cuyo final se espera en un futuro próximo. Las secuencias de estos genomas celulares completos aportan una rica fuente de información, incluyendo la identificación de muchos genes desconocidos hasta ahora. El resultado de estos proyectos de secuenciación de genomas se espera que estimulen muchos años de investigación en la biología molecular y celular, y tener un profundo impacto sobre nuestra comprensión y tratamiento de enfermedades humanas.

## Complejidad de los genomas de eucariotas

Los genomas de la mayoría de los eucariotas son grandes y más complejos que los de procariotas (Fig. 4.1). El gran tamaño de los genomas eucariotas no resulta sorprendente, puesto que uno debe esperar encontrar más genes en organismos que son más complejos. Sin embargo, el tamaño del genoma de muchos eucariotas no parece estar relacionado con la complejidad genética. Por ejemplo, los genomas de las salamandras y lirios contienen diez veces más cantidad de ADN que la encontrada en el genoma humano, y estos organismos no son diez veces más complejos que los humanos.

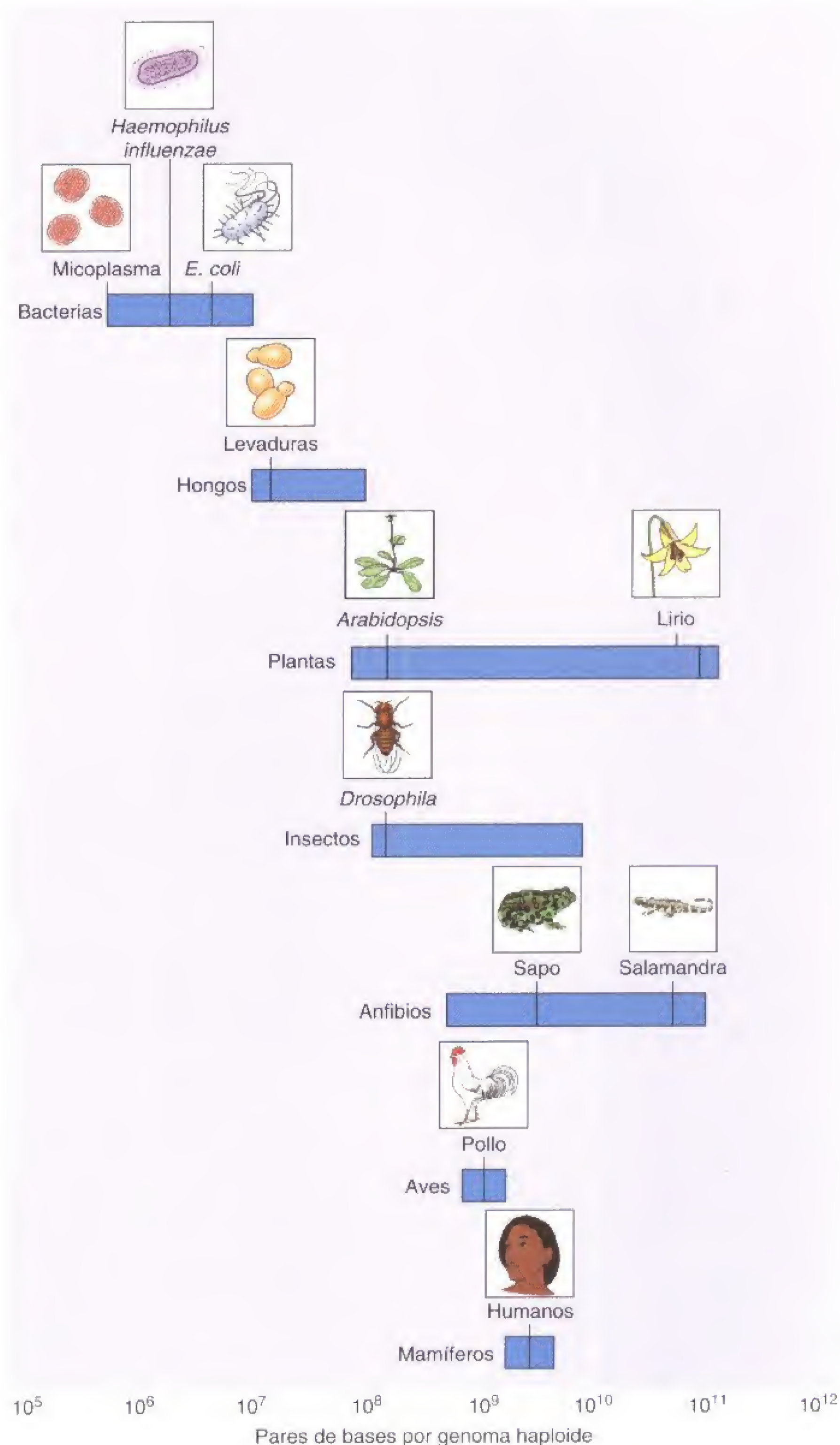



*Figura 4.1*
**Tamaño del genoma.** La variedad de tamaños de los genomas de los grupos representativos de organismos se muestra en una escala logarítmica.

Esta aparente paradoja se resolvió por el descubrimiento de que los genomas de la mayoría de las células eucariotas contienen no solo genes funcionales sino también grandes cantidades de secuencias de ADN que no codifican proteínas. La diferencia de tamaños entre los genomas de la salamandra y del hombre refleja grandes cantidades de ADN no codificante, en lugar de más genes, en el genoma de la salamandra. La presencia de grandes cantidades de

secuencias no codificantes es una propiedad universal de los genomas de los eucariotas complejos. Por tanto, el hecho de que el genoma humano es mil veces mayor en comparación con el de *E. coli* no solo se debe a un gran número de genes. Se cree que el genoma humano contiene aproximadamente 100.000 genes-alrededor de 25 veces más de los que contiene *E. coli*. Gran parte de la complejidad de los eucariotas humanos resulta de la abundancia de varios tipos diferentes de secuencias no codificantes, que constituyen la mayoría del ADN de las células eucariotas superiores.

### *Intrones y exones*

En términos moleculares, un **gen** puede definirse como un segmento de ADN que se expresa para dar un producto funcional, que puede ser un ARN (p. ej., ribosómico y transferente) o un polipéptido. Algunos ADN no codificantes en eucariotas representan largas secuencias de ADN que residen entre genes (**secuencias espaciadoras**). Sin embargo, también se encuentran grandes cantidades de ADN no codificante dentro de la mayoría de los genes eucariotas. Tales genes presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencia codificante (llamados **exones**) están separados por secuencias no codificantes (secuencias intermedias, o **intrones**) (Fig. 4.2). El gen completo se transcribe para producir una molécula larga de ARN en la que los intrones se han retirado mediante *splicing* o empalmes, por lo que solo los exones se encuentran incluidos en el ARNm. Aunque la mayoría no tienen una función conocida, representan una fracción sustancial de ADN en los genomas de los eucariotas superiores.

Los intrones se descubrieron por primera vez en 1977, en los laboratorios de Phillip Sharp y Richard Roberts independientemente, durante el estudio de la replicación de los adenovirus en cultivos de células humanas. Los adenovirus resultan ser un modelo útil para el estudio de la expresión génica, debido a que el genoma viral ocupa alrededor de $3,5 \times 10^4$ pares de bases y porque los ARNm de los adenovirus se producen a niveles muy altos en las células infectadas. Uno de los métodos para describir los ARNm de los adenovirus consistió en determinar las localizaciones de los correspondientes genes virales mediante el examen de los híbridos de ARN-ADN en el microscopio electrónico. Debido a que los híbridos de ARN-ADN se distinguen de los ADN de una sola hebra, es posible determinar las posiciones de los transcritos de ARN en una molécula de ADN. Sorprendentemente, tales experimentos revelaron que los ARNm de los adenovirus no hibridan con una sola región del ADN viral (Fig. 4.3). En su lugar, una sola molécula de ARNm híbrida con diversas regiones separadas del genoma viral. Por tanto, el ARNm del adenovirus no corresponde a un transcrito ininterrumpido de la hebra molde de ADN; sino que el ARNm se compone de bloques distintos de secuencias que proceden de diferentes partes del ADN viral. Se demostró que esto se debía al *splicing* o **empalme del ARN**, que se discutirá en detalle en el Capítulo 6.

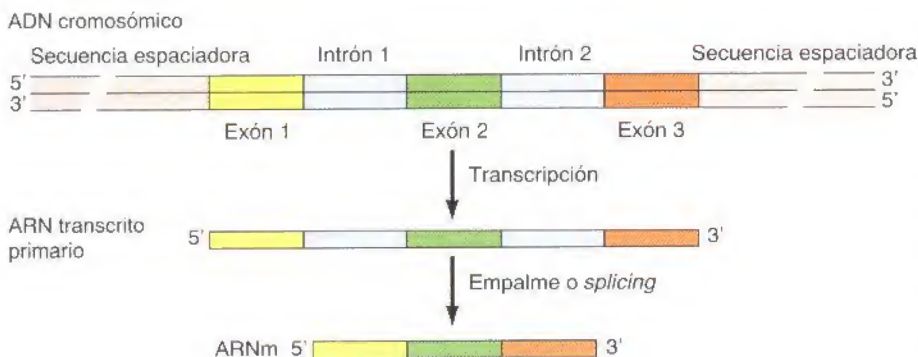
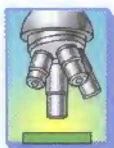



*Figura 4.2*
**Estructura de los genes eucariotas.** La mayoría de los genes eucariotas contienen segmentos de secuencias codificantes (exones) interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). Los exones e intrones se transcriben para producir un ARN transcrito primario largo. Después los intrones se desprenden mediante *splicing* o empalme para formar el ARNm maduro.



Experimento clave

# Descubrimiento de los intrones

***Splicing* o empalme de segmentos en el extremo 5' del ARNm tardío del adenovirus 2**
Susan M. Berget, Claire Moore, y Phillip A. Sharp

Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts
*Proceedings of the National Academy of Science USA, Volume 74, 1997, págs. 3.171-3.175*

## Contexto

Anterior a la clonación molecular, se sabía poco sobre la síntesis del ARNm en las células eucariotas. Sin embargo, estaba claro que el proceso era mucho más complejo en eucariotas que en bacterias. La síntesis de ARNm de eucariotas parece necesitar no solo la transcripción, sino también reacciones de procesamiento que modifican la estructura de los transcritos primarios. Es más, los ARNm eucariotas parecían sintetizarse como transcritos primarios largos, localizados en el núcleo, que luego son escindidos para dar lugar a moléculas de ARNm mucho más cortas que se exportan al citoplasma.

Estos pasos del procesamiento se asumieron como los responsables de la eliminación de las secuencias de los extremos 5' y 3' de los transcritos primarios. En este modelo, los ARNm embebidos dentro de los transcritos primarios largos estarían codificados por secuencias de ADN no interrumpidas. Esta visión de los ARNm eucariotas cambió radicalmente cuando se descubrió el *splicing* o empalme, de forma independiente por Berget, Moore, y Sharp, y por Louise Chow, Richard Gelinas, Tom Broker, y Richard Roberts (Una organización increíble de secuencia en los extremos 5' del ARN mensajero del adenovirus 2, Cell 12: 1-8, 1977).

## Experimentos

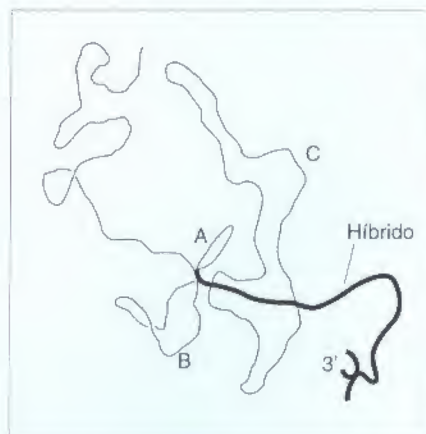
Ambos grupos de investigación que descubrieron el *splicing* o empalme utilizaron el adenovirus 2 para investigar la síntesis del ARNm en las células humanas. La mayor ventaja del virus es que proporciona un modelo que resulta mucho más simple que la célula huésped. El ADN viral se puede aislar directamente de las partículas virales, los ARNm codificadores de las estructuras de proteínas virales están presentes en tal cantidad que pueden ser purificados directamente de las células infectadas. Berget, Moore, y Sharp centraron sus experimentos en un ARNm abundante que codifica un polipéptido viral estructural conocido como el hexon.

Para mapear el ARNm del hexon en el genoma viral, se hibridó ARNm puro con ADN de adenovirus, y las moléculas híbridas se examinaron por microscopía óptica. Como se esperaba, el «cuerpo» del ARNm del hexon formó híbridos con fragmentos de restricción del ADN del adenovirus que previamente se había mostrado que contenían el gen del hexon. Sorprendentemente, sin embargo, secuencias en el extremo 5' del ARNm del hexon fallaron en la hibridación con las secuencias de ADN adyacentes a aquellas codificadoras del «cuerpo» del mensaje, sugiriendo que el extremo 5' del ARNm había surgido de secuencias localizadas en alguna otra parte del genoma viral. Esta posibilidad se probó mediante la hibridación del ARNm del hexon con un fragmento de restricción situado *upstream* del gen del hexon. Los híbridos ARNm-ADN formados en este experimento desplegaron una compleja estructura en forma de lazo (véase Figura). El «cuerpo» del ARNm formó una larga región híbrida con las secuencias de ADN del hexon previamente identificadas. Notablemente, el extremo 5' del ARNm del hexon hibridó con tres regiones *upstream* cortas del ADN, que estaban separadas entre ellas y del «cuerpo» del mensajero por largos lazos de ADN de una sola hebra. Las secuencias en el extremo 5' del ARNm del hexon por tanto parecían estar transcritas por tres regiones separadas del genoma viral, que fueron empalmadas al «cuerpo» del ARNm durante el procesamiento de un transcrito primario largo.

## Impacto

El descubrimiento del *splicing* o empalme en el ARNm del adenovirus estuvo seguido por experimentos similares con ARNm celulares, demostrando que los genes eucariotas tenían una estructura no esperada. En

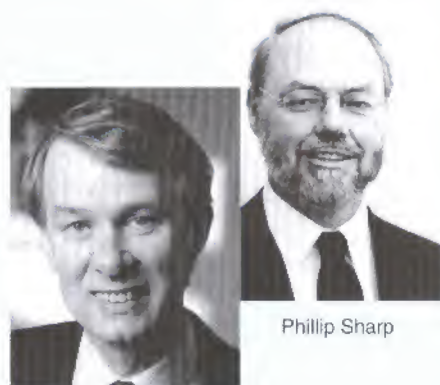





Micrografía electrónica y dibujo del ARNm del hexón hibridado con el ADN del adenovirus. Los lazos de hebra única designados con A, B, y C corresponden a intrones.

### *Descubrimiento de los intrones* (continuación)

lugar de ser continuas, sus secuencias codificantes estaban interrumpidas por intrones, que se eliminaban de los transcritos primarios mediante empalme. Ahora se sabe que los intrones representan la mayoría del ADN de los genomas eucariotas, y su papel en la evolución y en la regulación de la expresión génica continua formando parte de una de las áreas de investigación más activa. El descubrimiento del *splicing* o empalme también estimuló el interés por el mecanismo de esta reacción inesperada en el procesamiento del ARN. Como se discute en el Capítulo 6, estos estudios no solo han arrojado luz sobre nuevos mecanismos de regulación génica; han revelado también nuevas actividades catalíticas del ARN y proporcionado evidencia crítica para sustentar la hipótesis de que la evolución más temprana estuvo basada en la autorreplicación de las moléculas de ARN. La inesperada estructura del ARNm de los adenovirus ha tenido por tanto un impacto esencial en diversas áreas de la biología celular y molecular.



Phillip Sharp

Richard Roberts

(A) Gen del hexon

Exones

1 2 3 4

ADN del adenovirus

1 2 3

Intrones

(B) ADN monocatenario

Intrón 3

Extremo 5' del ARN

Exón 2

Exón 1

Híbrido ARN-ADN

Intrón 1

Exón 3

Exón 4

Intrón 2

Extremo 5' del ARN

*Figura 4.3*
**Identificación de intrones en el ARNm del adenovirus.** (A) El gen codificante del hexon adenovirus (una proteína estructural principal de la partícula viral) se compone de cuatro exones, interrumpidos por tres intrones. (B) Este dibujo ilustra a una micrografía electrónica de un híbrido hipotético entre ARNm del hexon y una porción del ADN del adenovirus. Los exones se ven como regiones híbridas de ARN-ADN, que están separadas por lazos de ADN monocatenario correspondientes a los intrones.

Poco después del descubrimiento de los intrones en los adenovirus, se hicieron observaciones similares en genes clonados de células eucariotas. Por ejemplo, el análisis por microscopio electrónico de los híbridos de ARN-ADN y de las secuencias de nucleótidos siguientes de los ADN y ADNc clonados indicó que la región codificante del gen de la $\beta$-globina del ratón (que codifica la subunidad $\beta$ de la hemoglobina) está interrumpida por dos intrones que se retiran del

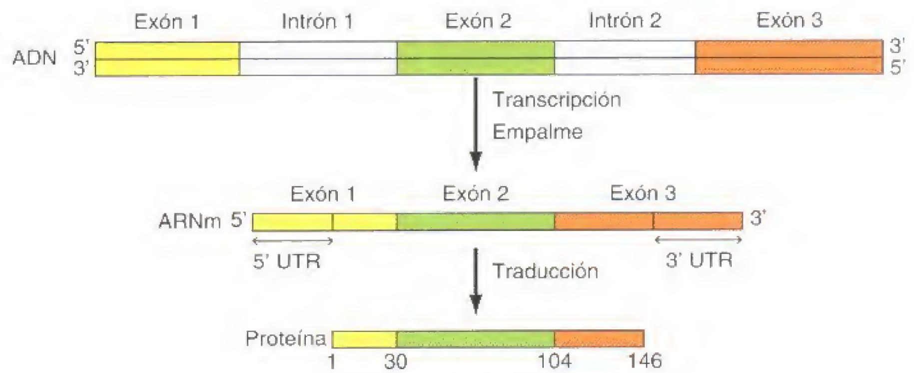



*Figura 4.4*
**Gen de la β globina en el ratón.** Este gen contiene dos intrones, que dividen a la región codificadora en tres exones. El exon 1 codifica a los aminoácidos del 1 al 30, el exon 2 codifica aminoácidos del 31 al 104, y el exon 3 codifica a los aminácidos del 105 al 146. Los exones 1 y 3 también contienen regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' del ARNm, respectivamente.

ARNm mediante empalme o *splicing* (Fig. 4.4). La estructura intrón-exón de muchos genes eucariotas es complicada, siendo la cantidad de ADN en las secuencias de los intrones con frecuencia más grandes que la de los exones. La secuencia del genoma humano indica que un gen humano promedio contiene aproximadamente 9 exones, interrumpidos por 8 intrones y distribuido a lo largo de aproximadamente 30.000 pares de bases (30 **kilobases**, o **kb**) de ADN genómico. Generalmente los exones suman en torno a 2 kb, de modo que más del 90% de un gen humano promedio consiste en intrones.

Los intrones están presentes en la mayoría de los genes de los eucariotas complejos, aunque no son universales. Casi todos los genes de las histonas, por ejemplo, carecen de intrones, por lo que claramente los intrones no son necesarios para la función del gen en las células eucariotas. Además, no se encuentran intrones en la mayoría de los genes de los eucariotas simples, como las levaduras. Por el contrario, los intrones están presentes en raros genes procariotas. La presencia o ausencia de intrones no es por tanto una distinción absoluta entre los genes procariotas y eucariotas, aunque los intrones prevalezcan en los eucariotas superiores (plantas y animales), donde representan una cantidad sustancial del ADN genómico total.

La mayoría de los intrones no especifican la síntesis de un producto celular, aunque algunos sí codifican ARNs o proteínas funcionales. Sin embargo, los intrones juegan papeles importantes en el control de la expresión génica. Por ejemplo, la presencia de intrones permite que los exones de un gen se unan en distintas combinaciones, resultando en la síntesis de distintas proteínas a partir del mismo gen. Este proceso, denominado **procesamiento alternativo o *splicing*** (Figura 4.5), ocurre con frecuencia en los genes de eucariotas complejos, y se cree muy importante para la extensión del repertorio funcional de los 30.000-40.000 genes del genoma humano.

Además se cree que los intrones han jugado un papel importante en la evolución, facilitando la recombinación entre regiones codificantes de proteína (exones) de distintos genes —un proceso conocido como arrastre de exones. Los exones con frecuencia codifican dominios de proteínas funcionales, de modo que la recombinación entre intrones de diferentes genes daría lugar a nuevos genes con nuevas combinaciones de secuencias codificantes de proteínas. Tal y como se predijo en la hipótesis, los estudios de secuenciación del ADN han demostrado que algunos genes son quimeras de exones derivados de otros varios genes, y proporcionan evidencia directa de que se pueden formar nuevos genes mediante la recombinación de secuencias de intrones.

El origen evolutivo de los intrones sigue siendo un tema controvertido. Una posibilidad es que los intrones estuviesen presentes en estadíos tempranos de la evolución, antes de la divergencia de las células procariotas y eucariotas. De acuerdo con esta hipótesis, los intrones desempeñarían un papel importante en la unión inicial entre las secuencias codificadoras de proteínas en los antepasados de las células actuales. Los intrones se fueron perdiendo paulatinamente

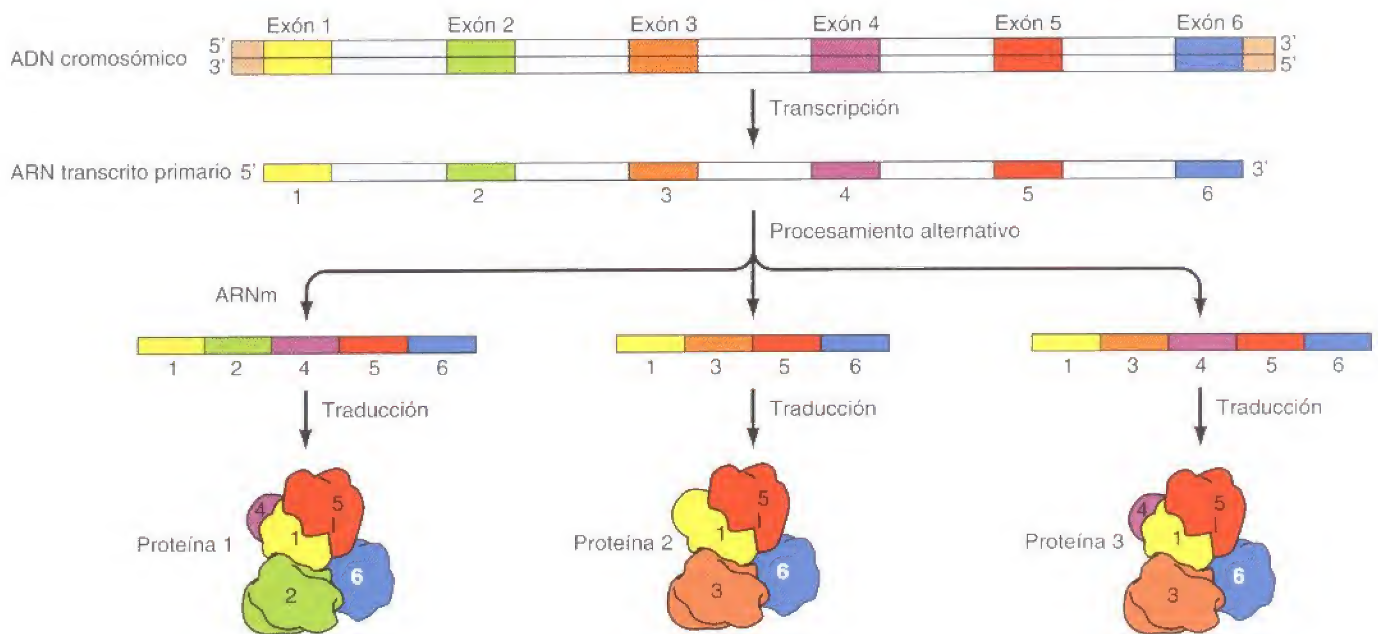



*Figura 4.5*
**Procesamiento alternativo.** El gen ilustrado contiene seis exones, separados por cinco intrones. El procesamiento alternativo permite que estos exones se unan en diferentes combinaciones, resultando en la formación de tres ARNm y proteínas diferentes a partir de un solo tránscrito primario.

en la mayoría de los genes procariotas y en los eucariotas simples (p. ej., levaduras) como respuesta a la selección evolutiva de la rápida replicación, lo que condujo al esbozo de los genomas de estos organismos. Sin embargo, puesto que la rápida división celular no es una ventaja para los eucariotas superiores, los intrones se han retenido en sus genomas. Alternativamente, los intrones han podido surgir más tarde en la evolución como resultado de la inserción de secuencias de ADN en genes que se habían formado como secuencias codificadoras de proteínas continuas. El arrastre de exones entonces hubiera desempeñado un papel importante en la evolución de los genes en los eucariotas superiores pero no hubiera participado en la unión inicial de las secuencias codificadoras de proteínas antes de la divergencia evolutiva de las células procariotas y eucariotas.

## *Secuencias de ADN repetitivas*

Los intrones forman una contribución sustancial al gran tamaño de los genomas de eucariotas superiores. En humanos, por ejemplo, los intrones forman aproximadamente el 25% del ADN genómico total. Sin embargo, una porción incluso mayor del genoma de los eucariotas complejos consiste en secuencias altamente repetidas de ADN no codificante. Estas secuencias, algunas veces presentes en cientos de miles de copias por genoma, fueron demostradas por primera vez por Roy Britten y David Kohne mientras estudiaban los valores de reasociación de fragmentos desnaturalizados de ADN celular (Fig. 4.6). Las hebras desnaturalizadas de ADN hibridan unas con otras (se reasocian), volviendo a formar moléculas de doble hebra (véase Fig. 3.25). Puesto que la reasociación de ADN es una reacción bimolecular (dos hebras separadas de ADN desnaturalizado deben colisionar entre ellas para hibridar), la velocidad de reasociación depende de la concentración de hebras de ADN. Cuando se desnaturalizaron fragmentos de ADN de *E. coli* y se permitió que hibridaran entre ellos, todo el ADN se reasoció a la misma velocidad, tal y como se esperaría si cada secuencia de ADN estuviera representada una sola vez por genoma. Sin embargo, la reasociación de fragmentos de ADN extraídos de células de mamíferos mostraron un patrón muy diferente. Aproximadamente el 50 % de los fragmentos de ADN se reasoció a una velocidad calculada para secuencias presentes una sola vez por genoma, pero el resto se reasoció mucho más rápi-

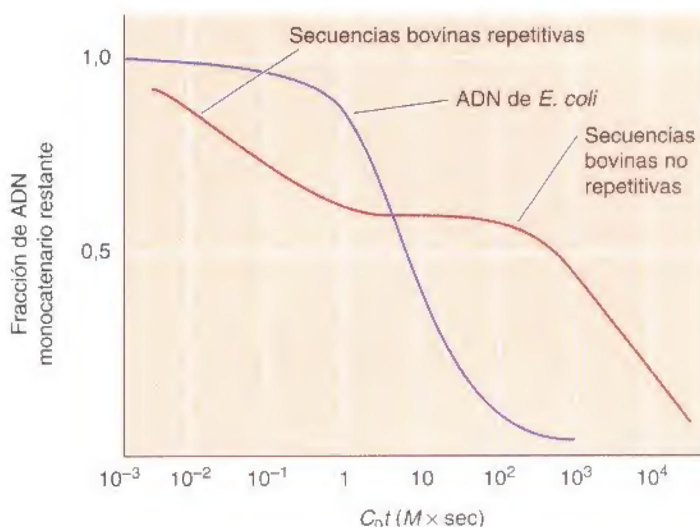



*Figura 4.6*
**Identificación de secuencias repetitivas mediante reasociación del ADN.** La cinética de la reasociación de los fragmentos de ADN de *E. coli* y bovino se ilustran como una función de $C_0t$, que es la concentración inicial de ADN multiplicada por el tiempo de incubación. El ADN de *E. coli* se reasocia en una proporción uniforme, de acuerdo con que cada fragmento se representa una vez en un genoma de $4{,}7 \times 10^6$ pares de bases. Por el contrario, los fragmentos de ADN bovino muestran dos pasos diferentes en su reasociación. Alrededor del 60 % de los fragmentos (las secuencias no repetitivas) se reasocia más lentamente que el ADN de *E. coli*, tal y como se esperaba para las secuencias representadas como únicas copias en el genoma bovino ($3 \times 10^9$ pares de bases). Sin embargo, el otro 40 % de los fragmentos del ADN bovino (las secuencias repetitivas) se reasocia más rápidamente que el ADN de *E. coli*, indicando la presencia de múltiples copias de estas secuencias.

do de lo esperado. La interpretación de estos resultados fue que algunas secuencias estaban presentes en múltiples copias y por tanto reasociaban más rápidamente que aquellas secuencias que estaban representadas una sola vez por genoma. En particular, estos experimentos indicaron que aproximadamente el 50% del ADN de mamíferos consiste en secuencias altamente repetitivas, algunas de las cuales se repiten de $10^5$ a $10^6$ veces.

Un mayor análisis, culminando en la secuenciación de genomas completos, ha identificado varios tipos de estas secuencias altamente repetidas (Tabla 4.1). Una clase (denominada **repeticiones de secuencias sencillas**) consiste en repeticiones en tandem de hasta miles de copias de secuencias cortas, que varían desde 1 hasta 500 nucleótidos. Por ejemplo, un tipo de repetición de secuencia sencilla en *Drosophila* consiste en repeticiones en tandem de una unidad de siete nucleótidos ACAAACT. Gracias a su composición de bases característica, muchos ADN de secuencia sencilla pueden ser separados del resto de ADN genómico mediante la centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de CsCl. La densidad del ADN está determinada por su composición de bases, donde las secuencias ricas en pares AT son menos densas que las secuencias ricas en pares GC. Así, un ADN de secuencia sencilla rico en AT bandea en un gradiente de CsCl a una densidad inferior que el resto del ADN genómico de *Drosophila* (Fig. 4.7). Ya que estas secuencias repetidas de ADN bandean como «satélites» separados de la banda principal de ADN, a menudo se denominan **ADNs satélite**. Estas secuencias está repetidas millones de veces por genoma, constituyendo aproximadamente el 10% del ADN de la mayoría de los eucariotas superiores. Los ADN de secuencia sencilla no se transcriben y no proporcionan información genética funcional. Algunos, sin embargo, representan papeles importantes en la estructura cromosómica, como se estudia en la siguiente sección de este capítulo.

**TABLA 4.1.** Secuencias repetitivas en el genoma humano

| Tipo de secuencia | Número de copias | Fracción del genoma |
|---|---|---|
| Repeticiones de secuencia sencilla[a] | >1.000.000 | ~10% |
| Retrotransposones | | |
| LINEs | 850.000 | 21% |
| SINEs | 1.500.000 | 13% |
| Elementos de tipo retrovirus | 450.000 | 8% |
| Transposones de ADN | 300.000 | 3% |

[a] El contenido de repeticiones de secuencia sencilla se estima a partir de la fracción de heterocromatina presente en el genoma humano.

Otras secuencias repetitivas de ADN se encuentran dispersas a través del genoma en lugar de agrupadas en repeticiones en tandem. Estos elementos repetitivos dispersos son un contribuyente muy importante para el tamaño del genoma, constituyendo aproximadamente el 45% del ADN genómico humano. Las dos clases más predominantes de estas secuencias se denominan **SINEs** (*short interspersed elements*) y **LINEs** (*long interspersed elements*). Los SINEs poseen una longitud de 100 a 300 pares de bases. Unas 1,5 millones de estas secuencias se encuentran dispersadas a través del genoma, constituyendo aproximadamente un 13% del ADN humano total. Aunque los SINEs se transcriben a ARN, no codifican proteínas y su función es desconocida. Los LINEs humanos principales poseen una longitud de 6-8 kb, aunque muchas de las secuencias repetidas derivadas de LINEs son más cortas, con un tamaño aproximado de 1 kb. Existen aproximadamente 850.000 repeticiones de secuencias LINEs en el genoma, constituyendo el 21% del ADN humano. Los LINEs se transcriben y al menos algunos de ellos codifican para proteínas, pero al igual que los SINEs, no poseen una función conocida en la fisiología celular.

Tanto las secuencias SINEs como LINEs son ejemplos de elementos transponibles, que son capaces de moverse a puntos distintos en el ADN genómico. Tal y como se describe en detalle en el Capítulo 5, tanto las secuencias SINEs como LINEs son **retrotransposones**, lo que significa que su transposición está mediada por la transcripción inversa (Fig. 4.8).Un ARN copia de una secuencia SINE o LINE es convertido en ADN por la transcriptasa inversa en el interior celular, y la nueva copia de ADN se integra en un nuevo punto del genoma. Una tercera clase de secuencias repetitivas dispersas, que se asemejan fuertemente a los retrovirus se denominan **elementos semejantes a retrovirus**, también se mueven dentro del genoma por transcripción inversa. Los elementos semejantes a retrovirus humanos varían desde aproximadamente 2-10 kb de longitud. Existen aproximadamente 450.000 elementos semejantes a retrovirus en el genoma humano, lo que constituye aproximadamente un 8% de ADN humano. Por el contrario, la cuarta clase de elementos repetitivos dispersos (**transposones de ADN**) se mueven por el genoma siendo copiados y reinsertados como secuencias de ADN, en lugar de moverse mediante transcripción inversa. En el genoma humano existen unas 300.000 copias de transposones de ADN, variando desde 80 a 3.000 pares de bases de longitud y constituyendo aproximadamente un 3% del ADN humano.

Así, prácticamente la mitad del genoma humano consiste en elementos repetitivos dispersos que se han replicado y movido a través del genoma a través de intermediarios de ARN o ADN. Merece la pena notar que la gran mayoría de

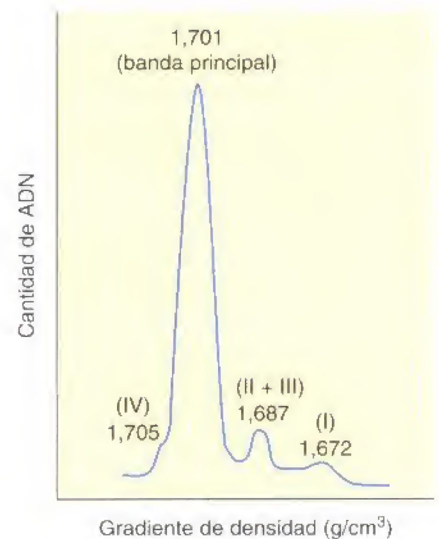



*Figura 4.7*
**ADN satélite.** La centrifugación de equilibrio del ADN de *Drosophila* en un gradiente de CsCl separa los ADN satélites (designados I-IV) con densidades en el gradiente (en g/cm$^3$) de 1,672, 1,687, y 1,705 de la banda principal del ADN genómico (con una densidad en el gradiente de 1,701).

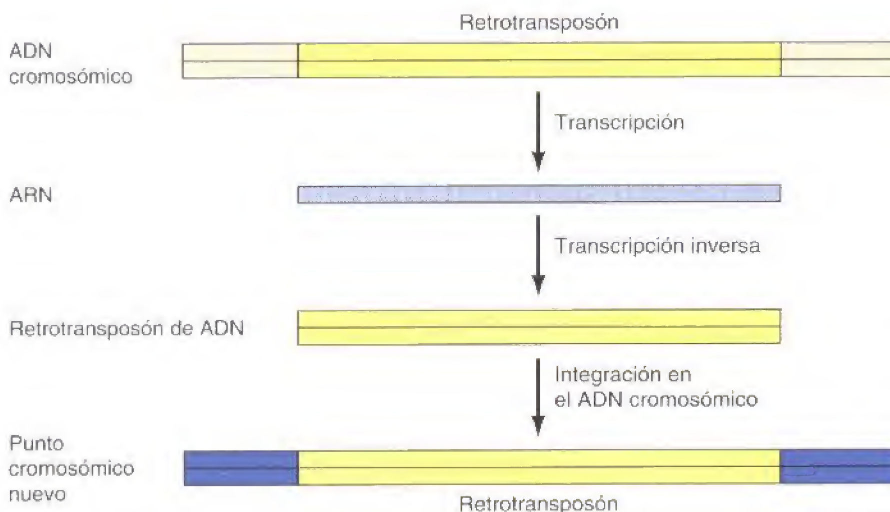



*Figura 4.8*
**Movimiento de retrotransposones**
Un retrotransposón presente en un punto del ADN cromosómico se transcribe en ARN, y a continuación es convertido de nuevo en ADN mediante transcripción inversa. El retrotransposón de ADN puede a continuación integrarse en un nuevo punto cromosómico.

estos elementos se transponen a través de intermediarios de ARN, de modo que la transcripción inversa ha sido responsable de la generación de más del 40% del genoma humano. Algunas de estas secuencias pueden ayudar en la regulación de la expresión génica, pero la mayoría de las secuencias repetitivas dispersas no parecen hacer una contribución útil a la célula. Por el contrario, parecen representar los «elementos de ADN egoístas» que han sido seleccionados por su propia capacidad de replicación dentro del genoma, en lugar de proporcionar una ventaja selectiva a su huésped. En algunos casos, sin embargo, los elementos transponibles han jugado un papel evolutivo importante, estimulando los reordenamientos genéticos y contribuyendo a la generación de la diversidad genética.

## *Duplicación génica y pseudogenes*

Otro de los factores que favorecen al gran tamaño de los genomas eucariotas es que algunos genes están presentes en múltiples copias, algunas de las cuales frecuentemente son afuncionales. En algunos casos, múltiples copias de genes son necesarias para producir ARNs o proteínas requeridas en grandes cantidades, como los ARNs ribosómicos o las histonas. En otros casos, miembros concretos de un grupo de genes relacionados (denominado una **familia génica**) pueden ser transcritos en diferentes tejidos o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de la hemoglobina se encuentran codificadas por familias de genes en el genoma humano, con diferentes miembros de esa familia expresados en el tejido embrionario, fetal, y tejidos adultos (Fig. 4.9). Los miembros de muchas familias de genes (p. ej., los genes de la globina) se agrupan en una región del ADN; los miembros de otras familias están dispersos en cromosomas diferentes.

Las familias de genes se cree que han surgido de la duplicación de un gen ancestral original, divergiendo los diferentes miembros de una familia como consecuencia de mutaciones durante la evolución. Tal divergencia puede desembocar en la evolución de proteínas relacionadas capaces de funcionar en tejidos diferentes o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las globinas fetales presentan una mayor afinidad para el $O_2$ que las globinas adultas —una diferencia que permite al feto obtener $O_2$ de la circulación materna.

Como cabría esperar, sin embargo, no todas las mutaciones favorecen la función del gen. Algunas copias genéticas presentan mutaciones sustanciales que ocasionan la pérdida de la capacidad para producir un producto genético funcional. Por ejemplo, las familias de genes humanos de la $\alpha$ y $\beta$ globina contienen dos genes que han sido desactivados por mutaciones. Tales copias genéticas no funcionales (llamados **pseudogenes**) representan reliquias evolutivas que aumentan considerablemente el tamaño de los genomas eucariotas sin hacer ninguna contribución genética funcional.

Las duplicaciones génicas pueden surgir por dos mecanismos diferentes. La primera es la duplicación de un segmento de ADN, que puede resultar en la transferencia de un bloque de ADN a una nueva localización en el genoma. Se estima que dichas duplicaciones de segmentos de ADN de entre 1 kb y más de

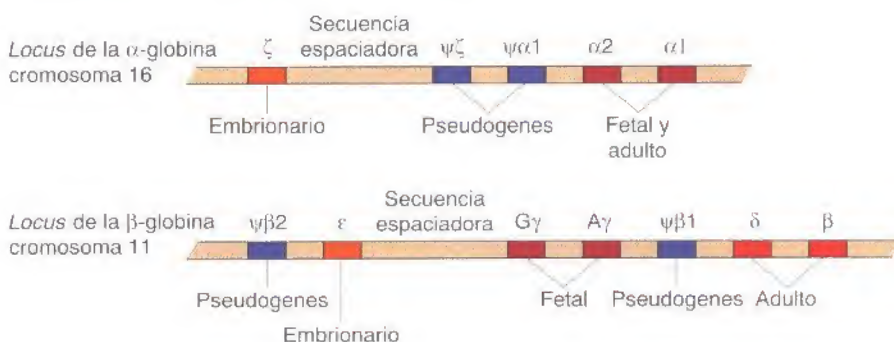



*Figura 4.9*
**Familias del gen de la globina.** Los miembros de las familias de los genes humanos de la $\alpha$ y $\beta$ globina se agrupan en los cromosomas 16 y 11, respectivamente. Cada familia contiene genes que se expresan específicamente en los tejidos embrionario, fetal, y adulto, además de las copias de genes no funcionales (pseudogenes).

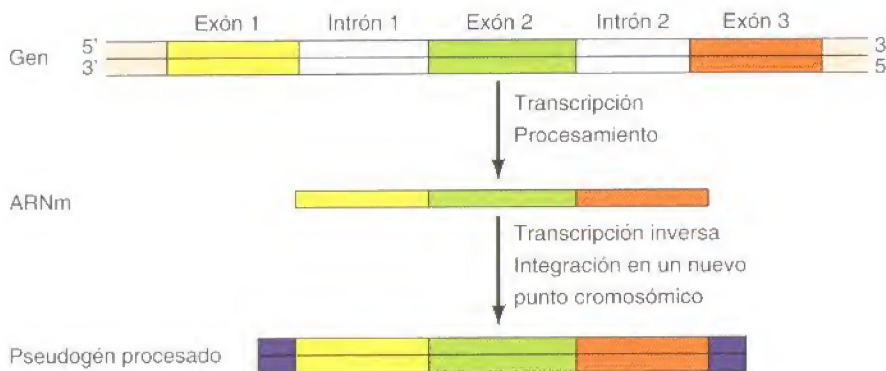



*Figura 4.10*
**Formación de un pseudogén procesado.** Un gen es transcrito y procesado para dar lugar a un ARNm del cual se han eliminado los intrones. El ARNm es copiado mediante transcripción inversa, dando lugar a una copia de ADNc careciente de intrones. La integración en el ADN cromosómico resulta en la formación de un pseudogén procesado.

50 kb, forman aproximadamente el 5% del genoma humano. Por otro lado, los genes pueden duplicarse mediante transcripción inversa de un ARNm, seguido de integración de la copia de ADNc en un nuevo punto cromosómico (Fig. 4.10). Este modo de duplicación génica, análogo a la transposición de elementos repetitivos a través de intermediarios de ARN, resulta en la formación de copias genéticas que carecen de intrones y que carecen también de las secuencias cromosómicas normales que dirigen la transcripción de un gen en ARNm. Como resultado, la duplicación de un gen por transcripción inversa generalmente da lugar a una copia génica inactiva denominada **pseudogén procesado**. Se estima que existen varios miles de pseudogenes procesados en el genoma humano.

## *Composición del genoma en los eucariotas superiores*

Una vez vistos varios tipos de ADN no codificante que contribuyen a la complejidad genómica de los eucariotas superiores, es de interés revisar la composición de los genomas celulares. En los genomas bacterianos, la mayor parte del ADN codifica proteínas. Por ejemplo, el genoma de *E. coli* es aproximadamente de unas $4,6 \times 10^6$ pares de bases de longitud y contiene unos 4.000 genes, donde casi un 90% del ADN son secuencias codificantes para proteínas. El genoma de levaduras, que consiste en $12 \times 10^6$ pares de bases, posee un tamaño 2,5 veces el de *E. coli*, pero sigue siendo extremadamente compacto. Sólo el 4% de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* contienen intrones, y normalmente éstos sólo poseen un pequeño intrón cerca del comienzo de la secuencia codificante. Aproximadamente un 70% del genoma de levaduras se emplea en secuencias codificantes de proteínas, especificando un total de aproximadamente 6.000 proteínas.

Los genomas animales relativamente sencillos de *C. elegans* y *Drosophila* son unas 10 veces más grandes que el genoma de levaduras, pero contienen sólo 2-3 veces más genes. Por el contrario, estos genomas animales sencillos contienen más intrones y más secuencias repetitivas, de modo que las secuencias codificantes de proteínas corresponden sólo al 25% del genoma de *C. elegans* y un 13% del genoma de *Drosophila*. El genoma de la planta modelo *Arabidopsis* contiene un número similar de genes, donde aproximadamente un 26% del genoma corresponde a secuencias codificantes de proteínas.

Los genomas de animales superiores (como el humano) son aproximadamente 20-30 veces más grandes que los de *C. elegans* y *Drosophila*. Sin embargo, una gran sorpresa obtenida al descifrar la secuencia del genoma humano, fue el descubrimiento de que el genoma humano sólo contiene aproximadamente de 30.000 a 40.000 genes —justo el doble del número de genes presente en el genoma de *C. elegans* o *Drosophila*—. Parece que sólo del 1 al 1,5% del genoma humano consiste en secuencias codificantes de proteína. Aproximadamente el 25% del genoma consiste en intrones, y más del 60% está compuesto

por varios tipos de secuencias de ADN repetitivo y duplicado, donde el resto está compuesto por pseudogenes, secuencias espaciadoras no repetitivas entre genes y secuencias de exones que están presentes en los extremos 5' y 3' de los ARNm pero que no se traducen en proteínas. El aumento del tamaño de los genomas de los eucariotas superiores, por lo tanto, se debe mucho más a la presencia de grandes cantidades de secuencias repetitivas e intrones, que al incremento del número de genes.

## Cromosomas y cromatina

No sólo los genomas de la mayoría de los eucariotas son más complejos que los de los procariotas, sino que el ADN de las células eucariotas se encuentra organizado de forma diferente al de las células procariotas. Los genomas de los procariotas los contienen cromosomas únicos, que normalmente son moléculas de ADN circulares. Por el contrario, los genomas de los eucariotas están compuestos por múltiples cromosomas, cada uno de los cuales contiene una molécula de ADN linear. Aunque el número y el tamaño de los cromosomas varia considerablemente entre las especies (Tabla 4.2), su estructura básica es la misma en todos los eucariotas. El ADN de las células eucariotas está fuertemente unido a unas pequeñas proteínas básicas (histonas) que empaquetan el ADN de manera ordenada en el núcleo de la célula. Esta característica resulta primordial, y se da en el ADN de la mayoría de los eucariotas. Por ejemplo, la longitud total extendida del ADN en una célula humana es de unos 2 m, pero este ADN debe caber en un núcleo con un diámetro de tan solo de 5 a 10 $\mu$m.

### *Cromatina*

Los complejos entre el ADN eucariótico y las proteínas forman la **cromatina**, que contiene alrededor del doble de proteína que de ADN. Las proteínas principales en la cromatina son las **histonas** —pequeñas proteínas que contienen una gran proporción de aminoácidos básicos (arginina y lisina) que facilitan la unión con la molécula de ADN cargada negativamente—. Existen 5 tipos importantes de histonas —llamadas H1, H2A, H2B, H3, y H4— que resultan muy similares entre las diferentes especies eucariotas (Tabla 4.3). Las histonas son

**TABLA 4.2.** Número de cromosomas en las células eucariotas

| Organismo | Tamaño del genoma (Mb)[a] | Número[a] de cromosomas |
|---|---|---|
| Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) | 12 | 16 |
| Moho del lodo (*Dyctiostelium*) | 70 | 7 |
| *Arabidopsis thaliana* | 125 | 5 |
| Maíz | 5.000 | 10 |
| Cebolla | 15.000 | 8 |
| Lirio | 50.000 | 12 |
| Nemátodo (*Caenorhabditis elegans*) | 97 | 6 |
| Mosca de la fruta (*Drosophila*) | 180 | 4 |
| Sapo (*Xenopus laevis*) | 3.000 | 18 |
| Pez pulmón | 50.000 | 17 |
| Pollo | 1.200 | 39 |
| Ratón | 3.000 | 20 |
| Vaca | 3.000 | 30 |
| Perro | 3.000 | 39 |
| Humano | 3.000 | 23 |

[a] Tanto el tamaño del genoma como el número de cromosomas son para células haploides.
Mb = millones de pares de bases.

**TABLA 4.3.** Principales proteínas de las histonas

| Histona[a] | Peso molecular | Número de aminoácidos | Porcentaje de lisina + arginina |
|---|---|---|---|
| H1 | 22.500 | 244 | 30,8 |
| H2A | 13.960 | 129 | 20,2 |
| H2B | 13.774 | 125 | 22,4 |
| H3 | 15.273 | 135 | 22,9 |
| H4 | 11.236 | 102 | 24,5 |

[a] Datos para las histonas de conejo (H1) y bovino.

tremendamente abundantes en las células eucariotas; su masa total resulta aproximadamente igual al ADN de la célula. Además, la cromatina contiene aproximadamente una masa igual de una variedad de proteínas cromosómicas diferentes a las histonas. Existen mas de un millar de tipos diferentes de estas proteínas, que están implicadas múltiples actividades, incluyendo la replicación del ADN y la expresión génica.

La unidad básica estructural de la cromatina, el **nucleosoma**, fue descrito por Roger Kornberg en 1974 (Fig. 4.11). Kornberg propuso el modelo de nucleosoma de acuerdo con dos tipos de experimentos. Primero, la digestión parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal (una enzima que degrada el ADN) produjo fragmentos de ADN con una longitud de 200 pares de bases. Por el contrario, una digestión similar de ADN desnudo (no asociado a proteínas)produjo una mancha continua de fragmentos de diferentes tamaños. Estos resultados sugirieron que la unión de las proteínas al ADN en la cromatina protege algunas regiones del ADN de la digestión por la nucleasa, de manera que la enzima puede atacar al ADN solamente en lugares separados por aproxima-

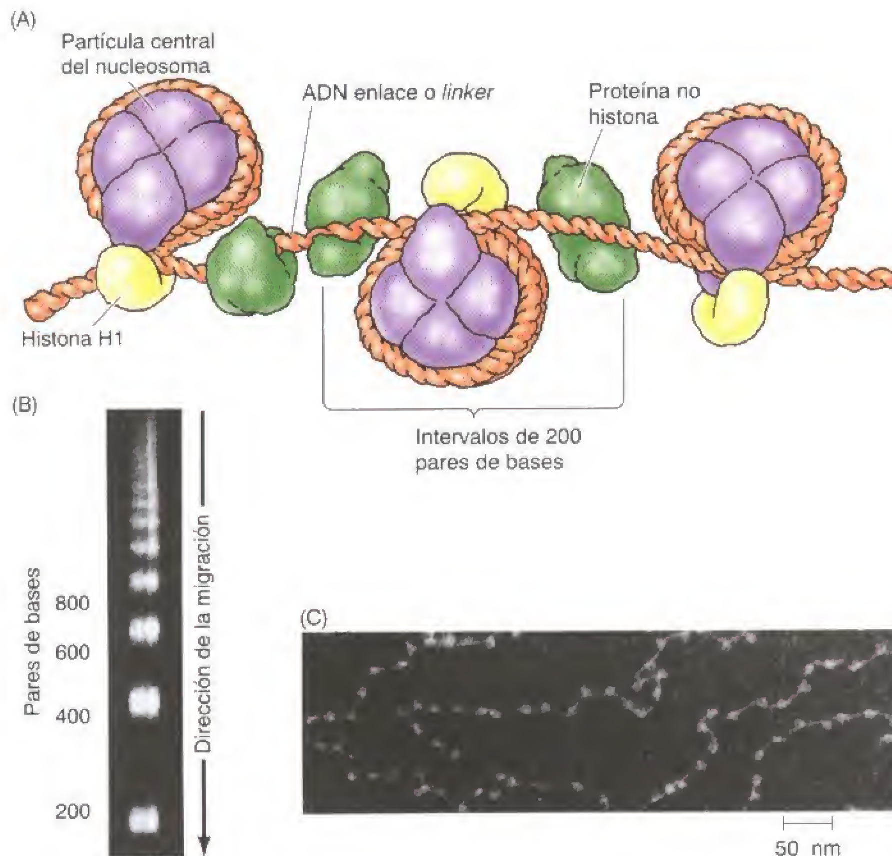
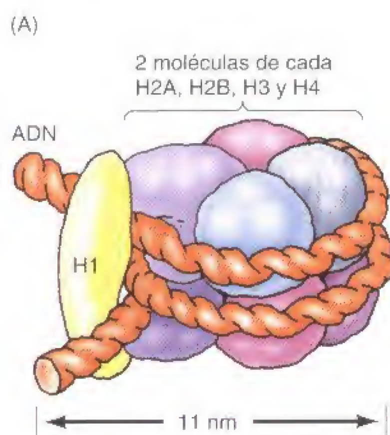



*Figura 4.11*
**Organización de la cromatina en nucleosomas.** (A) El ADN se envuelve alrededor de las histonas en las partículas centrales o core del nucleosoma y es sujetado por la histona H1. Las proteínas no histonas se unen al ADN de enlace o *linker* entre los nucleosomas y las partículas centrales. (B) Gel de electroforesis de fragmentos de ADN obtenidos de la digestión parcial de la cromatina con la nucleasa micrococal. El ADN de enlace entre las partículas centrales o *core* del nucleosoma es especialmente sensible, por lo que la digestión limitada de la cromatina produce fragmentos correspondientes a múltiplos de 200 pares de bases. (C) Una micrografía electrónica de una fibra de cromatina extendida, ilustrando su apariencia de collar de cuentas. (B, cortesía de Roger Kornberg, Stanford University; C; cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)



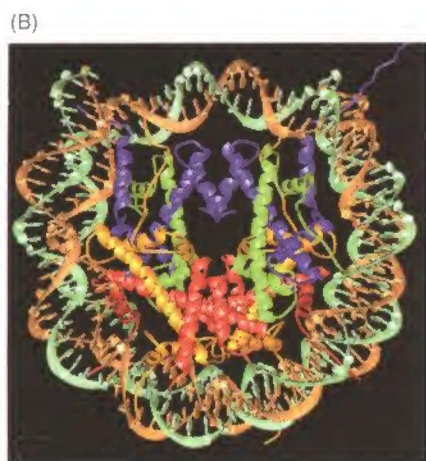



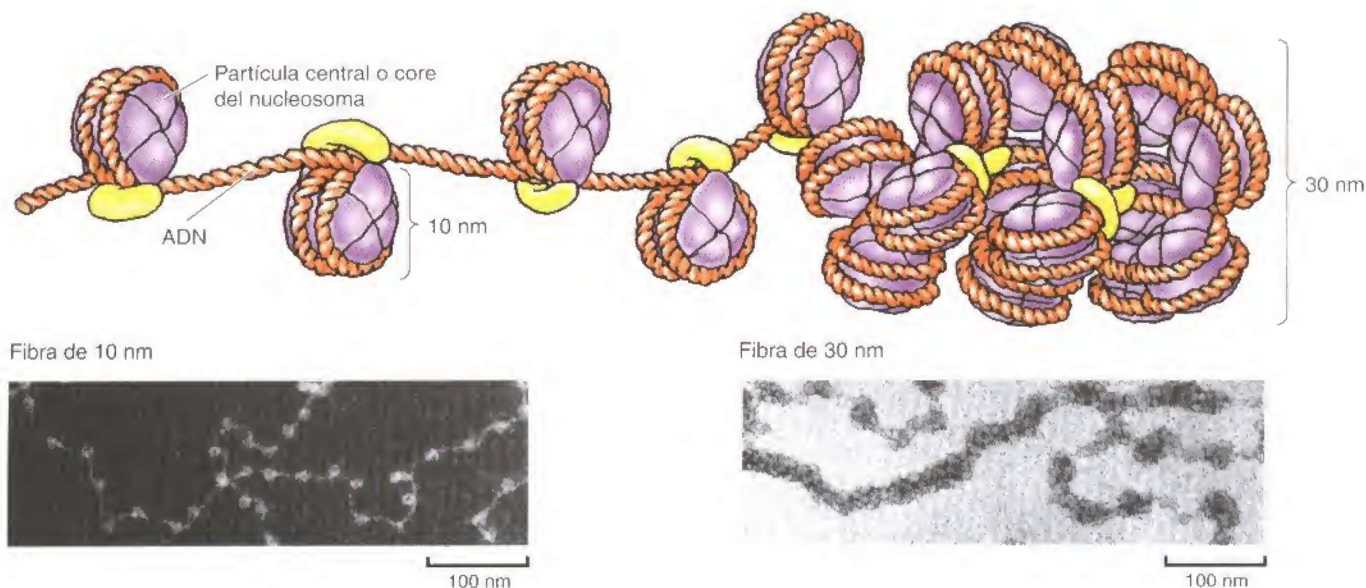

*Figura 4.12*
**Estructura de un cromatosoma.** (A) La partícula central o core del nucleosoma consta de 146 pares de bases de ADN envuelto 1,65 vueltas alrededor de un octamero de histonas que consta de dos moléculas de cada H2A, H2B, H3, y H4. Un cromatosoma contiene dos vueltas completas de ADN (166 pares de bases) sujetas por una molécula de H1. (B) Modelo de una partícula central o core del nucleosoma. Las cadenas de ADN se muestran en marrón y en turquesa. Las histonas se muestran en azul (H3), verde (H4), amarillo (H2A), y rojo (H2B). (B, de K. Luger et al., 1997. *Nature* 389: 251.)

damente 200 pares de bases. De acuerdo con esta idea, la microscopía electrónica reveló que las fibras de cromatina tienen una apariencia de collar de cuentas, con las cuentas separadas a intervalos de unas 200 pares de bases. Por tanto, la digestión por la nucleasa y los estudios por microscopía electrónica sugirieron que la cromatina está compuesta por unidades que se repiten cada 200 pares de bases, que fueron llamadas nucleosomas.

Una digestión más extensa de la cromatina con la nucleasa micrococal producía partículas (llamadas **partículas centrales o cores del nucleosoma**) que correspondían a las cuentas visibles por microscopia electrónica. Un análisis detallado de estas partículas demostró que contienen 146 pares de bases de ADN enrolladas 1,65 veces alrededor del centro de histonas formado por dos moléculas de H2A, H2B, H3, y H4 (las histonas del centro) (Fig. 4.12). Una molécula de la quinta histona, H1, se encuentra unida al ADN cuando entra en una partícula central o core del nucleosoma. Esto forma una subunidad de cromatina llamada **cromatosoma**, que esta compuesto por 166 pares de bases de ADN envuelto alrededor del centro de histonas y sujeto en su lugar por H1 (una histona de enlace).

El empaquetamiento del ADN con histonas produce una fibra de cromatina aproximadamente de 10 nm de diámetro y compuesta por cromatosomas separados por segmentos de enlace o *linker* de ADN de unas 80 pares de bases de longitud (Fig. 4.13). En el microscopio electrónico, esta fibra de 10 nm presenta la apariencia de collar de cuentas que sugiere el modelo del nucleosoma. Empaquetar el ADN en una fibra de cromatina de 10 nm reduce su longitud aproximadamente seis veces. La cromatina se puede condensar aún más enrollándola en fibras de 30 nm, estructura que aún no se ha conseguido determinar. Las

*Figura 4.13*
**Fibras de cromatina.** El empaquetamiento del ADN en los nucleosomas produce una fibra de cromatina de aproximadamente 10 nm de diámetro. La cromatina se condensa aún más enrollándose en una fibra de 30 nm de diametro, con unos seis nucleosomas por vuelta. (Fotografías cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)




Fibra de 10 nm

100 nm

Fibra de 30 nm

100 nm

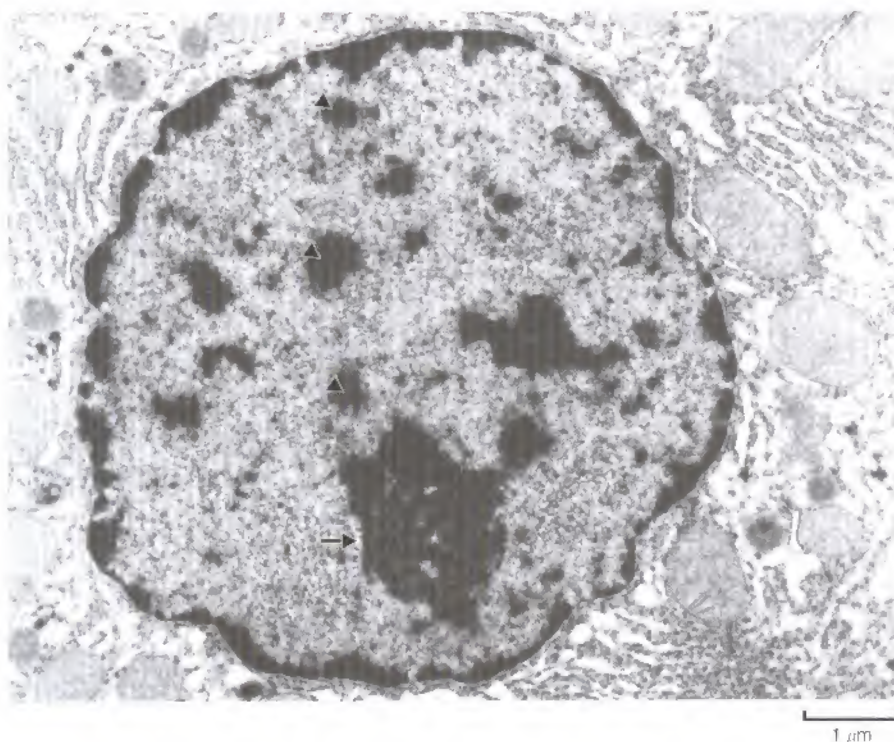



*Figura 4.14*
**Cromatina en la interfase.** Micrografía electrónica de un núcleo en interfase. La eucromatina se distribuye por el núcleo. La heterocromatina se indica con los triángulos y el nucléolo con una flecha. (Cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

interacciones con las histonas H1 parece ser que desempeñan un importante papel en esta etapa de la condensación de la cromatina.

La duración de la condensación de la cromatina varia según el ciclo de la vida de la célula. En células en interfase (sin dividirse), la mayoría de la cromatina (llamada **eucromatina**) se encuentra relativamente sin condensar y distribuida por todo el núcleo (Fig. 4.14). Durante este periodo del ciclo celular, los genes se transcriben y el ADN se replica como preparación para la división. La mayoría de la eucromatina en los núcleos en interfase parece presentarse en forma de fibras de 30 nm, organizadas en grandes lazos que contienen aproximadamente de 50 a 100 kb de ADN. Alrededor del 10 % de la eucromatina, que contiene los genes que son transcritos activamente, se encuentra en un estado menos condensado (formación en 10 nm) lo que permite la transcripción. La estructura de la cromatina esta por tanto unida al control de la expresión génica en los eucariotas, tal y como se discutirá en el Capítulo 6.

Al contrario de la eucromatina, alrededor del 10 % de la cromatina de la interfase (llamada **heterocromatina**) se encuentra en un estado muy condensado que recuerda a la cromatina de las células que llevan a cabo la mitosis. La heterocromatina es transcripcionalmente inactiva y contiene secuencias de ADN altamente repetitivas, como aquellas presentes en los centrómeros y telómeros.

Cuando la célula entra en mitosis, sus cromosomas se condensan para poder ser distribuidos a las células hijas. Los lazos de fibras de cromatina de 30 nm se cree que se doblan sobre sí mismos para formar los cromosomas compactos de la metafase de las células mitóticas, en las que el ADN se ha condensado cerca de 10.000 veces (Fig. 4.15). Esta cromatina condensada no puede ser utilizada como molde para la síntesis de ARN, así que la transcripción cesa durante la

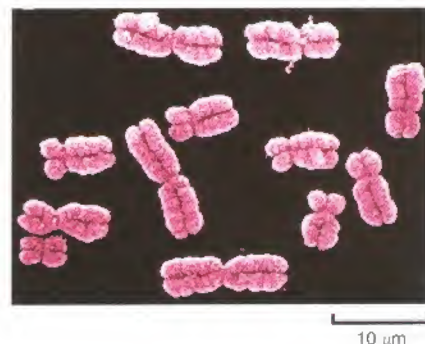



*Figura 4.15*
**Condensación de la cromatina durante la mitosis.** Micrografía electrónica de barrido de cromosomas de metafase. Añadido color artificial. (Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.)

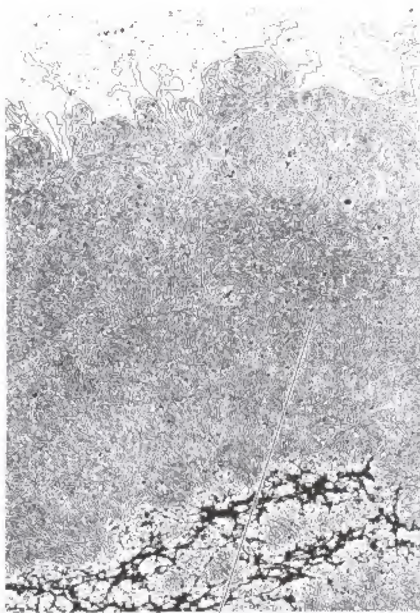



*Figura 4.16*
**Estructura de los cromosomas de la metafase.** Una micrografía electrónica de lazos de ADN unidos al andamio de proteína de los cromosomas en metafase que han sido liberados de las histonas. (De J. R. Paulson y U. K. Laemmli, 1977. *Cell* 12: 817.)

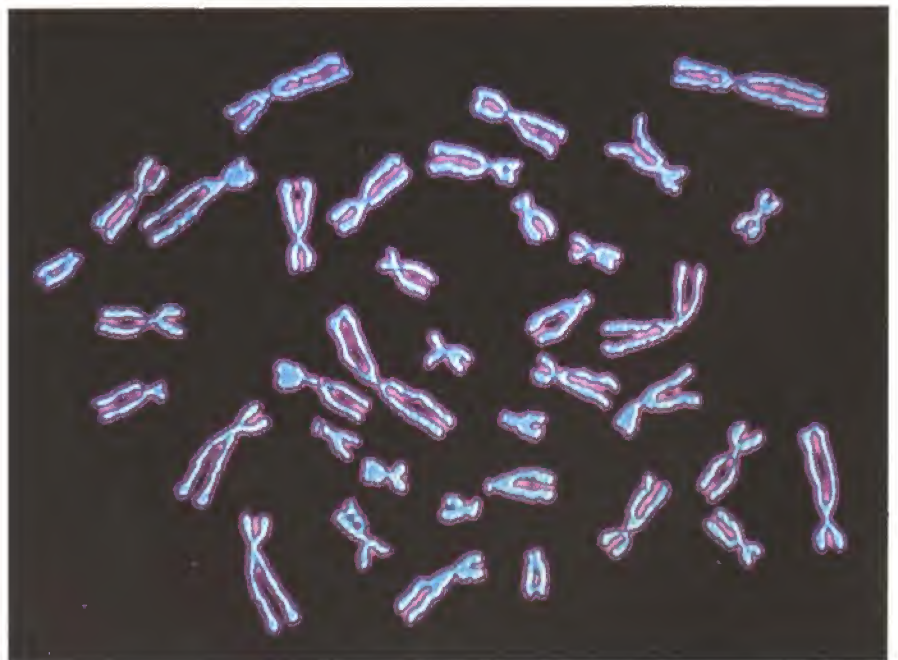
mitosis. Las micrografías electrónicas indican que el ADN en los cromosomas de la metafase está organizado en grandes lazos unidos a un andamio o escalón de proteínas (Fig. 4.16), aunque todavía no se ha llegado a entender con detalle la estructura de la cromatina condensada ni el mecanismo de condensación de ésta.

Los cromosomas de la metafase se encuentran en un estado de concentración muy alto, tanto que su morfología puede ser estudiada a través del microscopio óptico (Fig. 4.17). Las diferentes técnicas de tinción proporcionan patrones característicos de bandas cromosómicas luminosas y oscuras, como resultado de la unión preferente de los tintes fluorescentes o de manchas a las secuencias de ADN ricas en AT en lugar de las secuencias ricas en GC. Estas son específicas para cada cromosoma y parecen representar diferentes regiones de los cromosomas. Los genes pueden ser localizados en bandas cromosómicas específicas mediante hibridación *in situ,* indicando que el empaquetamiento del ADN en los cromosomas de la metafase es un proceso con un riguroso orden y de carácter reproducible.

## *Centrómeros*

El **centrómero** es una región especializada del cromosoma cuyo papel es asegurar la correcta distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas durante la mitosis (Fig. 4.18). El ADN celular se duplica durante la interfase, resultando la formación de dos copias de cada cromosoma antes de que comience la mitosis. Cuando la célula entra en mitosis, la condensación de la cromatina conduce a la formación de los cromosomas de la metafase que consisten en dos cromátidas hermanas idénticas. Estas cromátidas hermanas se

*Figura 4.17*
**Cromosomas humanos en metafase.** Una micrografía de cromosomas humanos extendidos a partir de una célula en metafase. (Leonard Lessin/Peter Arnold, Inc.)



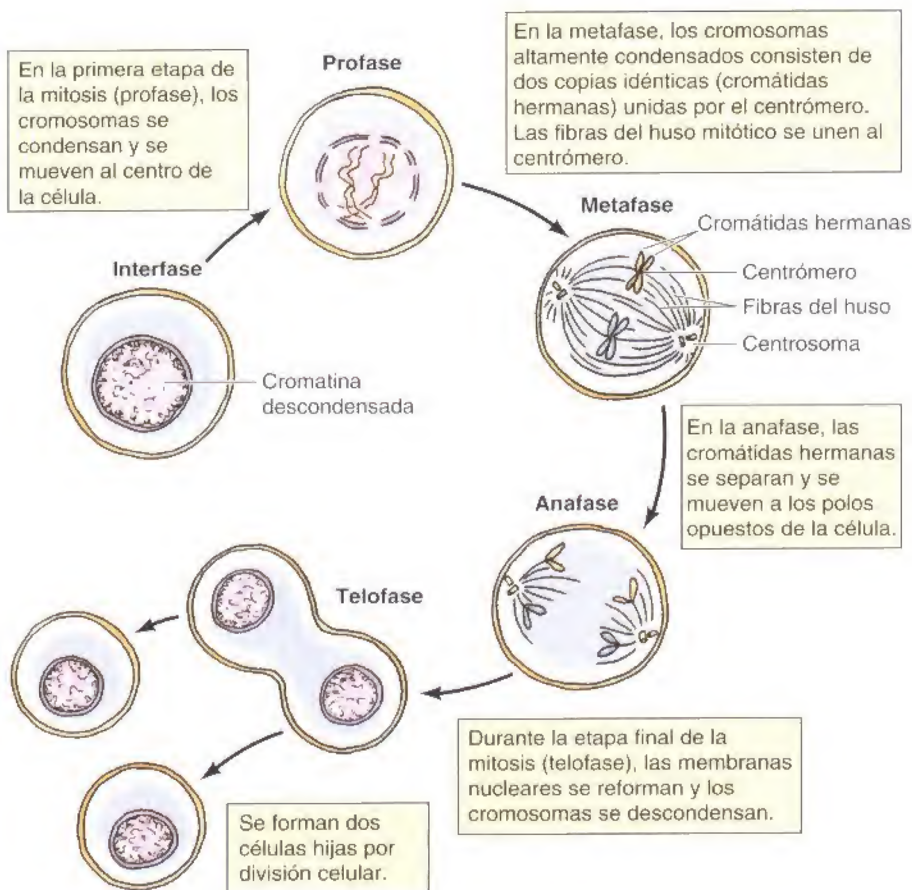



*Figura 4.18*
**Cromosomas durante la mitosis.** Puesto que el ADN se replica durante la interfase, la célula contiene dos copias duplicadas idénticas de cada cromosoma antes de entrar en mitosis.

mantienen unidas por el centrómero, el cual se considera como una región cromosómica compacta. Una vez iniciada la mitosis, los microtúbulos del huso mitótico se adhieren al centrómero, y las dos cromátidas hermanas se separan y se dirigen a los polos opuestos del huso. Al final de la mitosis, las membranas nucleares se restablecen y los cromosomas se descondensan, resultando la formación de los núcleos de las células hermanas que contienen una copia de cada cromosoma parental.

Los centrómeros, por tanto, sirven como sitios de asociación de las cromátidas hermanas y como sitios de unión para los microtúbulos del huso mitótico. Son secuencias específicas de ADN a las que se unen numerosas proteínas de unión asociadas a los centrómeros, formando una estructura llamada **cinetocoro** (Fig. 4.19). La unión de los microtúbulos a las proteínas del cinetocoro dirige la unión de los cromosomas al huso mitótico. Las proteínas asociadas al cinetocoro actúan como «motores moleculares» que conducen el movimiento de los cromosomas a lo largo de las fibras del huso, segregando los cromosomas a los núcleos de las células hijas.

Las mejores secuencias de ADN centroméricas han sido descritas en levaduras, donde su función puede probarse siguiendo la segregación de los plásmidos en mitosis (Fig. 4.20). Los plásmidos que contienen centrómeros funcionales se segregan como los cromosomas y se distribuyen de igual forma a las células hijas una vez terminada la mitosis. En ausencia de un centrómero funcional, sin embargo, el plásmido no se segrega adecuadamente, y muchas células hijas no heredan el ADN del plásmido. Los ensayos de este tipo han permitido determinar las secuencias necesarias para la función del centrómero. Este tipo de experimentos mostraron por primera vez que las secuencias de los centrómeros de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran aproximadamente en 125 pares de bases divididas en tres elementos de secuencia: dos

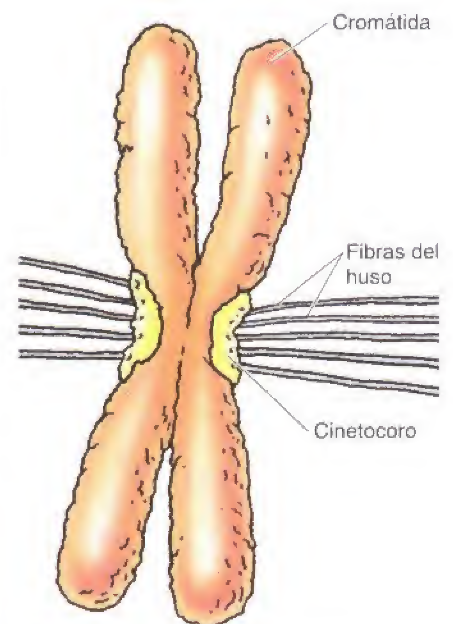



*Figura 4.19*
**Centrómero en cromosomas de metafase.** El centrómero es la región por donde las dos cromátidas hermanas siguen unidas en la metafase. Proteínas específicas se unen al ADN centromérico, formando el cinetocoro, que es el lugar de anclaje de las fibras del huso.

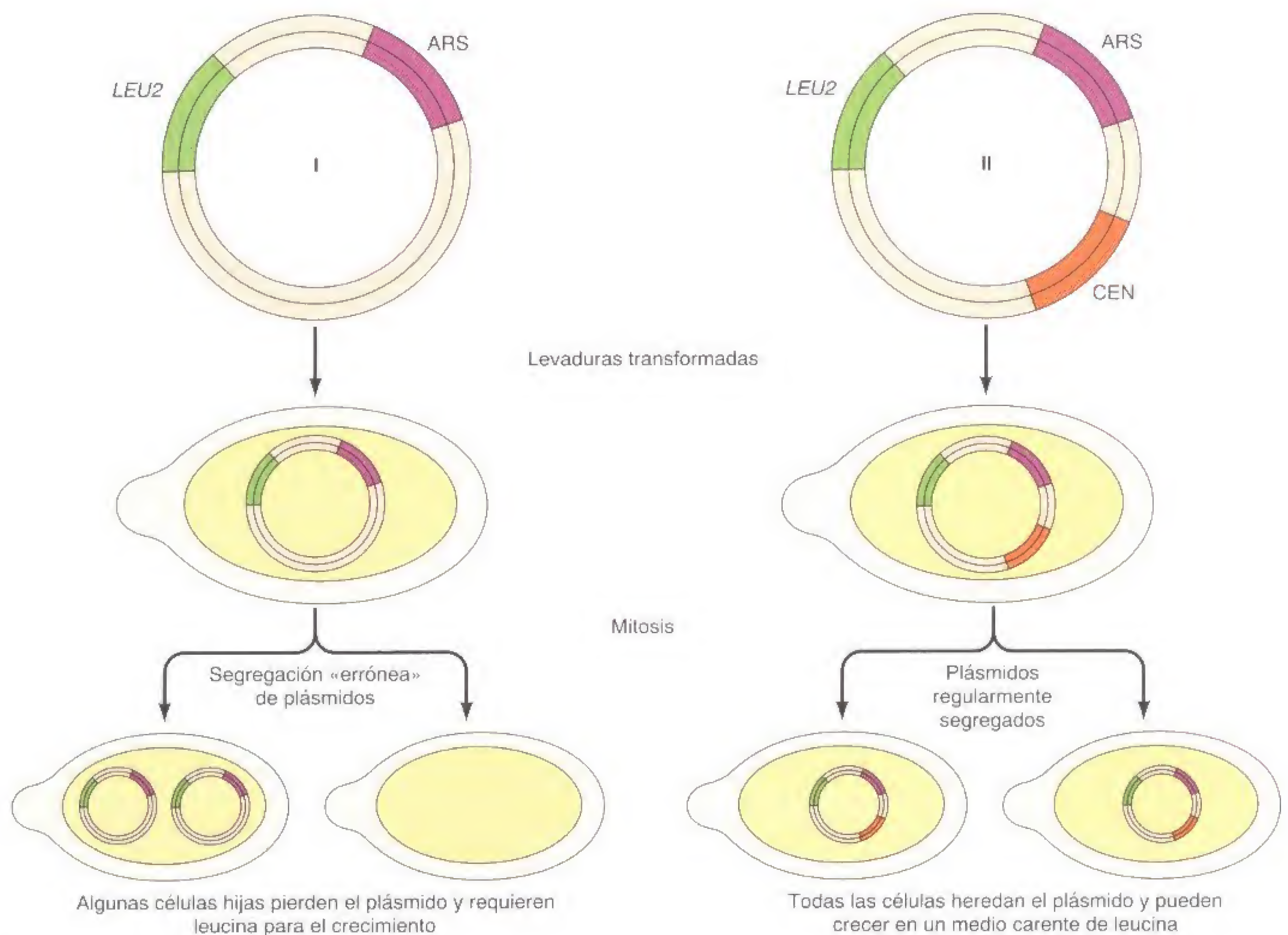



*Figura 4.20*
**Ensayo de un centrómero en levaduras.** Ambos plásmidos contienen un marcador (*LEU2*) y secuencias de ADN que sirven como orígenes de replicación en levaduras (ARS, que significa secuencia de replicación autónoma). Sin embargo, el plásmido I carece de un centrómero y por lo tanto se pierde con frecuencia como resultado de una segregación errónea durante la mitosis. Por el contrario, la presencia de un centrómero (CEN) en el plásmido II asegura su transmisión regular a las células hijas.

secuencias cortas de 8 a 25 pares de bases separadas por 78-86 pares de bases de un ADN muy rico en AT (Fig. 4.21A).

Las secuencias cortas de los centrómeros definidas en *S. cerevisiae*, no obstante, no parecen reflejar la situación en otros eucariotas. Estudios más recientes han definido los centrómeros de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* mediante un método funcional similar. Aunque *S. cerevisiae* y *S. pombe* son levaduras, parecen ser muy divergentes la una de la otra y muy diferentes en muchos aspectos de su biología celular. Estas dos especies de levaduras proporcionan modelos complementarios para el estudio de células eucariotas simples y de fácil estudio. Los centrómeros de *S. pombe* se extienden de 40 a 100 kb de ADN; son aproximadamente mil veces más largos que los de *S. cerevisiae*. Se componen de un centro de 4 a 7 kb de una sola copia de ADN flanqueada por secuencias repetitivas (Fig. 4.21B). Tanto el centro como las secuencias repetitivas flanqueantes son necesarios para el funcionamiento del centrómero, por lo que los centrómeros de *S. pombe* parecen ser considerablemente más complejos que los de *S. cerevisiae*.

Los estudios de un cromosoma de *Drosophila* han proporcionado la primera descripción de un centrómero en eucariotas superiores Fig. 4.21C). El centrómero de *Drosophila* se extiende 420 kb, del cual la mayoría (más del 85%) consta de dos ADN satélites muy repetitivos con las secuencias AATAT y AAGAG. El resto del centrómero consta de elementos transponibles dispersos, que se encuentran también en otros sitios en el genoma de *Drosophila*, además de una región no repetitiva de ADN rica en AT. La deleción de las secuencias

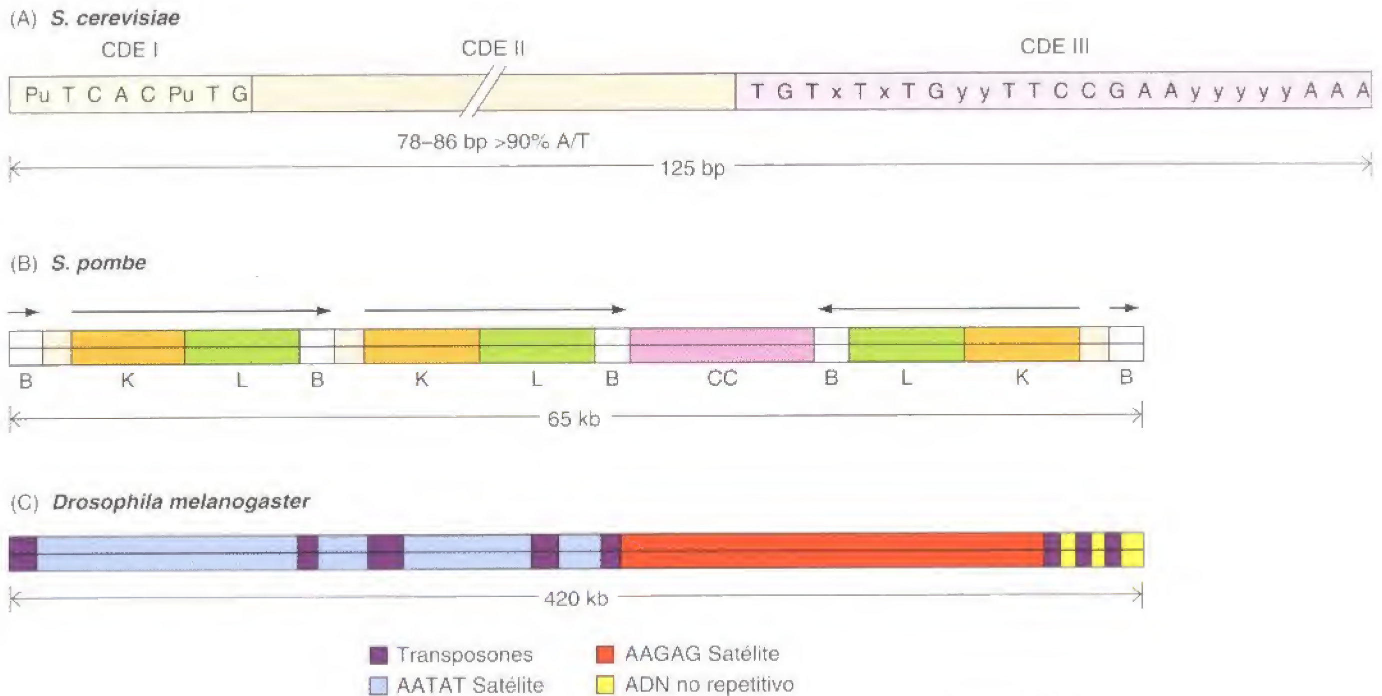



*Figura 4.21*
**Centrómeros de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *Drosophila melanogaster*.** (A) Las secuencias del centrómero de *S. cerevisiae* (CEN) se componen de dos secuencias conservadas cortas (CDEI y CDEIII) separadas por 78 a 86 pares de bases (pb) de ADN rico en AT (CDEII). Las secuencias mostradas son secuencias consenso derivadas del análisis de las secuencias de los cemtrómeros de cromosomas individuales de levaduras. Pu = A o G; x = A o T; y = cualquier base. (B) Se ilustra la organización de las secuencias del centrómero del cromosoma II de *S. pombe*. El centrómero consiste en un grupo central (CC) de secuencia única de ADN, rodeado por repeticiones en tándem de tres elementos de secuencia repetitivos (B, K, y L). (C) El centrómero de *Drosophila* consiste en dos secuencias satélite, elementos transponibles y ADN no repetitivo.

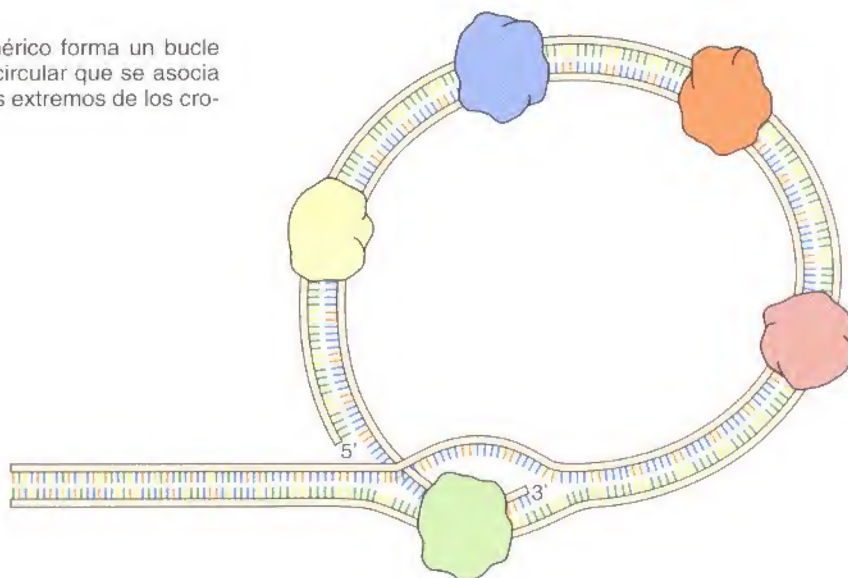
satélites y de los elementos transponibles, además del ADN no repetitivo, reduce la actividad del centrómero en los ensayos funcionales. Por tanto, las secuencias repetitivas y no repetitivas parecen contribuir a la formación del cinetocoro y a la función del centrómero. Los centrómeros de *Arabidopsis* también parecen ocupar de 500 a 1.000 kb y consisten principalmente en secuencias altamente repetitivas.

Los centrómeros de mamíferos se caracterizan por las extensas regiones de heterocromatina que consisten en secuencias de ADN satélite altamente repetitivas. En humanos y otros primates la secuencia centromérica principal es el ADN satélite $\alpha$, que es una secuencia de 171 pares de bases situada en repeticiones en tándem que pueden abarcar hasta millones de pares de bases. Se ha visto que el ADN satélite $\alpha$ une proteínas asociadas al centrómero, y experimentos recientes han demostrado que la zona del satélite $\alpha$ centromérico del cromosoma X humano es suficiente para actuar como un centrómero funcional. Sin embargo, también se han descrito cromosomas humanos anómalos con centrómeros funcionales que carecen de ADN satélite $\alpha$, de modo que las necesidades exactas para la correcta función del centrómero en los eucariotas superiores siguen siendo desconocidas.

## Telómeros

Las secuencias situadas al final de los cromosomas de eucariotas, llamados **telómeros**, desempeñan un papel crítico en la replicación y el mantenimiento del cromosoma. Los telómeros inicialmente se reconocieron como estructuras distintas ya que los cromosomas rotos eran altamente inestables en las células eucariotas, implicando la necesidad de secuencias específicas en las terminaciones cromosómicas normales. Esto se demostró mediante experimentos en los que los telómeros del protozoo *Tetrahymena* fueron añadidos a los extremos de moléculas lineales de ADN plasmídico de levaduras. La suma de estas secuencias de ADN telomérico permitió a estos plásmidos replicarse como cromosomas lineales igual que las moléculas en las levaduras, demostrando directamente que los telómeros son necesarios para la replicación de las moléculas lineales de ADN.

*Figura 4.22*
**Estructura de un telómero.** El ADN telomérico forma un bucle sobre sí mismo para formar una estructura circular que se asocia con un número de proteínas que protegen los extremos de los cromosomas.




Las secuencias de ADN de los telómeros de los eucariotas son similares, presentando repeticiones de una secuencia simple de ADN que contiene grupos de residuos de G en una hebra (Tabla 4.4). Por ejemplo, la secuencia de las repeticiones de los telómeros en humanos y en otros mamíferos es AGGGTT, y la repetición telomérica en *Tetrahymena* es GGGGTT. Estas secuencias se repiten cientos o miles de veces, por tanto extendiéndose hasta varias kilobases, y terminando con un resto de ADN de hebra única. Las secuencias repetidas del ADN telomérico forman bucles al final de los cromosomas además de unir un cierto número de proteínas que protegen los extremos del cromosoma de la degradación o de ser unidos (Figura 4.22).

Los telómeros desempeñan un papel importante en la replicación de los extremos de las moléculas de ADN linear (véase Cap. 5). La ADN polimerasa es capaz de extender una cadena de ADN en crecimiento pero no puede iniciar la síntesis de una nueva cadena al final de una molécula linear de ADN. Como consecuencia, las terminaciones de los cromosomas lineales no pueden ser replicadas por la ADN polimerasa en condiciones normales. Este problema se ha solucionado mediante la evolución de un mecanismo especial, que implica la actividad de la transcriptasa inversa, para replicar las secuencias de ADN telomérico. El mantenimiento de los telómeros parece ser un factor importante a la hora de determinar las expectativas de vida y la capacidad reproductiva de las células, por lo que los estudios de los telómeros y de la telomerasa son prometedores al respecto de nuevos datos sobre cuestiones como la edad y el cáncer.

**TABLA 4.4.** ADN teloméricos

| Organismo | Secuencia telomérica repetida |
|---|---|
| Levaduras | |
| *Saccharomyces cerevisiae* | $G_{1-3}T$ |
| *Schizosaccharomyces pombe* | $G_{2-5}TTAC$ |
| Protozoo | |
| *Tetrahymena* | GGGGTT |
| *Dyctiostelium* | $G_{1-8}A$ |
| Planta | |
| *Arabidopsis* | AGGGTTT |
| Mamífero | |
| Humano | AGGGTT |

## Secuencias de los genomas completos

Algunos de los esfuerzos más excitantes en la biología molecular son los dirigidos actualmente hacia la obtención y análisis de las secuencias completas de nucleótidos del genoma humano y de los genomas de diversos modelos de organismos, incluyendo a *E. coli, Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Drosophila, Arabidopsis* y el ratón (Tabla 4.5). Los resultados de la secuenciación de genomas completos nos han llevado más allá de la caracterización de genes individuales hasta una visión global de la organización y contenido génico de genomas completos. En principio, este enfoque posee el potencial de identificar a todos los genes de un organismo, que por tanto, se volverán accesibles a investigaciones sobre su estructura y función. Sin embargo, aprender cómo interpretar una cantidad tan inmensa de datos generados por la secuenciación de genomas completos supone nuevos retos, y ha dado lugar a

**TABLA 4.5.** Resumen de los genomas secuenciados

| Organismo | Tamaño del genoma (Mb)[a] | Número de genes | Secuencia codificadora de proteínas |
|---|---|---|---|
| Bacterias | | | |
| *Mycoplasma genitalium* | 0,58 | 470 | 89% |
| *H. influenzae* | 1,8 | 1.743 | 89% |
| *E. coli* | 4,6 | 4.288 | 88% |
| Levaduras | | | |
| *C. cerevisiae* | 12 | 6.000 | 70% |
| *S. pombe* | 12 | 4.800 | 60% |
| Invertebrados | | | |
| *C. elegans* | 97 | 19.000 | 25% |
| *Drosophila* | 180 | 13.600 | 13% |
| Plantas | | | |
| *Arabidopsis thaliana* | 125 | 26.000 | 25% |
| Arroz | 440 | 30.000-50.000 | ~10% |
| Mamíferos | | | |
| Humano | 3.200 | 30.000-40.000 | 1-1,5% |

[a] Mb = millones de pares de base.

una nueva área de estudio denominada **bioinformática**, que se encuentra en el interfaz entre la biología y la informática y está enfocada hacia el desarrollo de los métodos computacionales necesarios para analizar y obtener información biológica útil, a partir de la secuencia de miles de millones de bases que componen un genoma tan grande como el humano. Aunque queda mucho por aprender, las secuencias de genomas que ya están disponibles han proporcionados a los científicos una base de datos única, consistente en las secuencias de nucleótidos de grupos completos de genes. Debido a que muchos de estos genes no habían sido con anterioridad identificados, la determinación de sus funciones constituirá la base de futuros estudios en biología celular.

### *Genomas procariotas*

Ahora conocemos las secuencias completas del genoma de más de sesenta bacterias diferentes, y aún más están en proceso de ser determinadas. La primera secuencia completa de un genoma celular, anunciada en 1995 por un equipo de investigadores dirigido por J. Craig Venter, fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*, un habitante común del tracto respiratorio humano. El genoma de *H. influenzae* tiene aproximadamente $1,8 \times 10^6$ pares de bases (1,8 **megabases** o **Mb**), un poco menos de la mitad del tamaño del genoma de *E. coli*. La secuencia completa de nucleótidos indicó que el genoma de *H. influenzae* es una molécula circular compuesta por 1.830.137 pares de bases. La secuencia fue analizada para identificar los genes que codifican los ARNr, ARNt y proteínas. Las regiones potenciales codificadoras de proteínas se identificaron mediante el análisis por ordenador de la secuencia de ADN para detectar las **fases de lectura abiertas** —tramos largos de secuencia de nucleótidos que pueden codificar polipéptidos ya que no contienen ninguno de los tres codones de terminación de la cadena (UAA, UAG, y UGA)—. Debido a que estos codones de terminación de la cadena aparecen aleatoriamente una vez cada 21 codones (3 codones de terminación en un total de 64), los marcos de lectura abiertos que se extienden más de cien codones normalmente representan genes funcionales.

Este análisis identificó seis copias de genes ARNr, 54 genes ARNt diferentes, y 1.743 regiones potenciales codificadoras de proteínas en el genoma de *H. influenzae* (Fig. 4.23). De éstas, más de mil pueden tener un papel biológico (p. ej., una enzima del ciclo del ácido cítrico) en base a su relación con secuencias de proteínas conocidas, pero los otros representan genes de funciones no co-

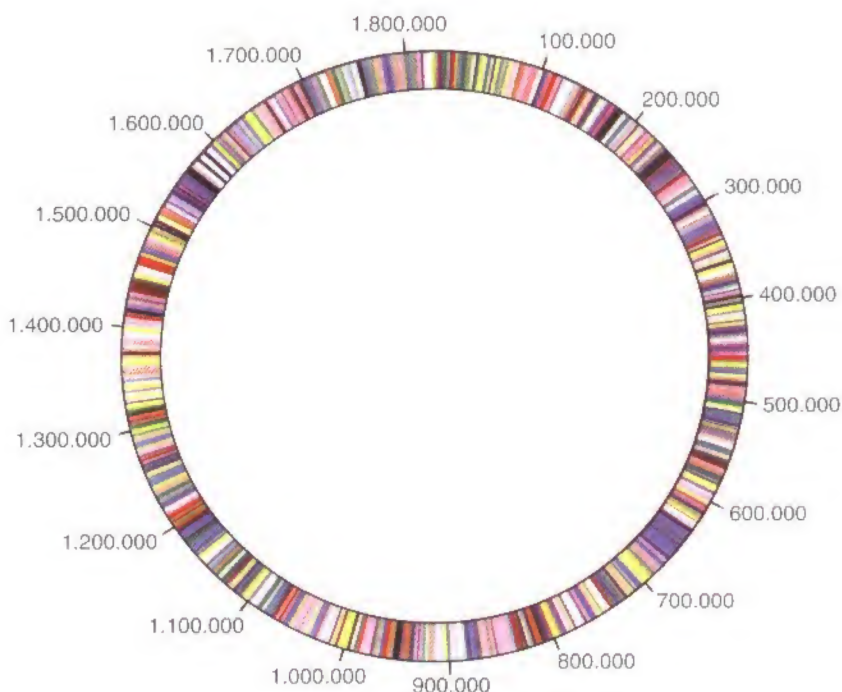



*Figura 4.23*
**Genoma de *Haemophilus influenzae*.** Las regiones codificadoras de proteínas predecibles se designan con las barras de colores. Los números indican pares de bases de ADN. (De R. D. Fleischmann et al., 1995. *Science* 269: 496.)

nocidas hasta ahora. Las secuencias codificantes esperadas tienen un tamaño medio de aproximadamente 900 pares de bases, por lo que cubren unas 1,6 Mb de ADN, correspondiendo a casi un 90% del genoma de *H. influenzae*.

La secuencia completa del genoma de *Mycoplasma genitalium* es de particular interés puesto que los micoplasmas son las bacterias más simples presentes hoy en día y contienen los genomas más pequeños de todas las células conocidas. El genoma de *M. genitalium* es de tan sólo 580 kb (0,58 Mb) de largo y debe representar el menor juego de genes necesarios para mantener la replicación propia de un organismo. El análisis de su secuencia de ADN indica que *M. genitalium* contiene 470 secuencias codificadoras de proteínas , que corresponde aproximadamente al 88% del ADN genómico (Fig. 4.21). Muchas de estas secuencias fueron identificadas como genes codificadores de proteínas implicados en la replicación del ADN, transcripción, traducción, transporte a través de membranas y metabolismo energético. Sin embargo, *M. genitalium* contiene menos genes para enzimas metabólicas que *H.influenzae*, mostrando un metabolismo más limitado. Por ejemplo, muchos genes conocidos que codifican componentes de procesos biosintéticos no se encuentran en el genoma de *M. genitalium*, probando su necesidad de obtener precursores de aminoácidos y nucleótidos de un organismo huésped. De forma interesante, el genoma de *Mycoplasma* también incluye aproximadamente 150 genes con función desconocida. Por tanto, incluso en las células más simples, los papeles biológicos de muchos genes continúan por determinarse.

La secuencia del genoma de la arqueobacteria *Metanococcus jannaschii*, anunciado en 1996, aportó una nueva visión sobre las relaciones evolutivas entre las arqueobacterias, eubacterias y los eucariotas. El genoma de *M. jannaschii* tiene 1,7 Mb y contiene 1.738 supuestas secuencias codificadoras de proteínas —similar en tamaño al genoma de *H. influenzae*—. Sin embargo, solamente alrededor de un tercio de las secuencias codificadoras de proteínas identificadas en *M. jannaschii* estaban relacionadas con genes conocidos de eubacterias o eucariotas, demostrando la composición genética diferente de las arqueobacterias. Los genes de *M. jannaschii* codificadores de proteínas implicados en la producción de energía y en la biosíntesis de los constituyentes de la célula están relacionados con los de las eubacterias, lo que sugiere que el proceso metabólico

básico evolucionó a partir de un antepasado común de las arqueobacterias y eubacterias. Es importante, sin embargo, que los genes de *M. jannaschii* codificadores de proteínas implicados en la replicación del ADN, transcripción, y traducción están más relacionados con los eucariotas que con las eubacterias. La secuenciación del genoma de esta arqueobacteria indica por tanto que las arqueobacterias y los eucariotas comparten una línea común de descendencia evolutiva y que están más relacionados entre sí que con las eubacterias (véase Fig. 1.8).

Aunque la relativa simplicidad y facilidad de la genética de *E. coli* lo ha convertido en un organismo favorable para la biología molecular, el genoma de 4,6 Mb de *E. coli* no se completó hasta 1997. El análisis de la secuencia de *E. coli* revela un total de 4.288 genes, con un 88 % del genoma representado por secuencias codificadoras de proteínas. De los 4.288 descubiertos mediante secuenciación, 1.835 habían sido identificados con anterioridad y las funciones de 821 pudieron ser deducidas por comparaciones con las secuencias de genes ya descritos en otros organismos. Sin embargo, las funciones de 1.632 genes de *E. coli* (cerca del 40 % del genoma) no pudieron ser determinadas. Por tanto, incluso para un organismo tan estudiado como *E. coli*, la secuenciación genómica demuestra que aún queda mucho por descubrirse en la biología celular de los procariotas.

## *El genoma de levaduras*

Como ya dijimos anteriormente, el genoma eucariota más sencillo ($1{,}2 \times 10^7$ pares de bases de ADN) se encuentra en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Además, las levaduras crecen rápido y son objeto de manipulaciones genéticas simples. Por tanto, las levaduras son un modelo de célula eucariota que puede ser estudiada con mayor facilidad que las células de los mamíferos u otros eucariotas superiores. Como consecuencia, la secuenciación completa de un cromosoma de levadura en 1992 (Fig. 4.22), seguida de la determinación de la secuencia completa del genoma en 1996, representaron los pasos más importantes en el entendimiento de la biología molecular de las células eucariotas.

El genoma de *S. cerevisiae* contiene unos 6.000 genes, incluyendo 5.885 supuestas secuencias codificadoras de proteínas, 140 genes de ARN ribosómicos, 275 genes de ARN transferente y 40 genes codificadores de pequeños ARN nucleares implicados en el procesamiento del ARN (discutido en el Cap. 6). Las levaduras tienen, por tanto, una alta densidad de secuencias codificadoras de proteínas, similar a los genomas bacterianos, que representan aproximadamente el 70 % del ADN total de la levadura. De acuerdo con esto, los genes de *S. cerevisiae* que contienen intrones normalmente tienen un único intrón pequeño cerca del principio del gen.

El análisis por ordenador fue capaz de asignar una supuesta función a aproximadamente 3.000 de las secuencias codificadoras de proteínas de *S. cerevisiae* basado en las similitudes con las secuencias de genes conocidos. En base al análisis de estos genes, resultó que aproximadamente el 11 % de las proteínas de levaduras funciona en el metabolismo, 3 % en la producción y almacenaje de la energía metabólica, 3 % en la replicación del ADN, reparación, y recombinación, 7 % en la transcripción, 6 % en la traducción, y un 14 % en la clasificación y transporte de proteínas. Sin embargo, las funciones de muchos de estos genes se conocen solamente en términos generales (como «factores de transcripción»), de tal forma que su función específica dentro de la célula aún necesita ser determinada. Además, debido a que la mitad de las proteínas codificadas por el genoma de las levaduras no estaban relacionadas con los genes o fases de lectura abiertas descritos con anterioridad, es necesario descubrir mediante análisis genéticos y bioquímicos las funciones de otras 3.000 proteínas desconocidas.

La secuencia del genoma de *S. cerevisiae* ha sido seguida recientemente por la secuencia del genoma de la levadura de fisión, *S. pombe*. Como se ha descrito previamente en este capítulo, *S. cerevisiae* y *S. pombe* son bastante divergentes y diferentes en muchos aspectos de su biología, incluyendo la estructura de sus

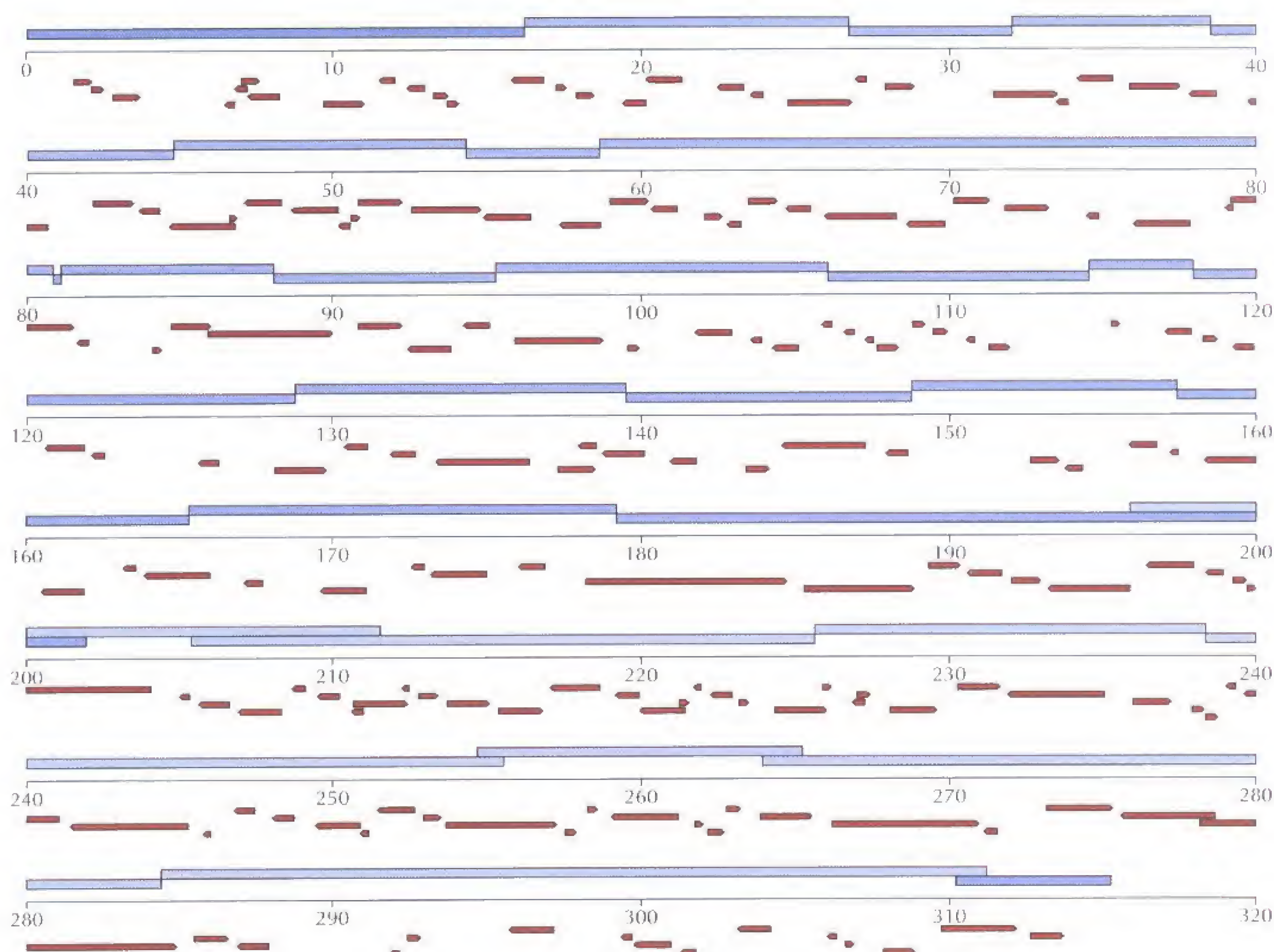



*Figura 4.24*
**Cromosoma III de levaduras.** Las barras superiores azules designan los clones utilizados para la secuenciación del ADN. Los marcos abiertos de lectura o fases de lectura abiertas se indican con flechas. (De S. G. Oliver et al., 1992. *Nature* 357: 38.)

centrómeros (Fig. 4.21). Es interesante notar que sus genomas también muestran diferencias considerables. A pesar de que tanto *S. cerevisiae* como *S. pombe* poseen aproximadamente la misma cantidad de ADN de secuencia única (12,5 Mb), *S. pombe* parece contener sólo unos 4.800 genes. Los intrones son mucho más prevalecientes en *S. pombe* que en *S. cerevisiae*. Aproximadamente el 43% de los genes de *S. pombe* contienen intrones y ´estos son mayores que los de *S. cerevisiae*, de modo que la secuencia codificadora de proteína constituye aproximadamente el 60% del genoma de *S. pombe*. La mayoría de los genes de *S. pombe* poseen homólogos en el genoma de *S. cerevisiae*, pero aproximadamente 700 genes son exclusivos de *S. pombe*.

Ahora que se han completado las secuencias de los genomas de levaduras, la determinación de las funciones de los muchos nuevos genes descritos tanto para *S. cerevisiae* y *S. pombe* es una objetivo principal. Afortunadamente, las levaduras resultan muy manejables para llevar a cabo el análisis funcional de los genes desconocidos debido a la facilidad con la que los *loci* cromosómicos normales pueden ser desactivados por recombinación homóloga con secuencias clonadas (véase Fig. 3.39). Por tanto, sistemáticamente se puede aplicar un análisis funcional directo a los genes de las levaduras que inicialmente fueron identificados en función de su secuencia de nucleótidos. La secuenciación del genoma de las levaduras ha abierto la puerta al estudio de nuevas áreas de la biología de esta célula eucariota simple. Se espera que estos estudios descubran las funciones de muchos genes nuevos que no son exclusivos de las levaduras sino que son comunes a todos los eucariotas, incluyendo a los humanos.

### *Los genomas de* Caenorhabditis elegans *y* Drosophila melanogaster

Los genomas de *C. elegans* y *Drosophila* son genomas animales relativamente sencillos, intermedios en tamaño y complejidad entre las levaduras y los humanos. Características distintivas de cada uno de estos organismos los convierte en modelos importantes para el análisis genómico: *C. elegans* ha sido utilizado ampliamente en estudios de desarrollo animales y *Drosophila* ha sido especialmente bien analizado genéticamente. Los genomas de estos organismos, sin embargo, son aproximadamente diez veces mayores que los de levaduras, introduciendo un nuevo orden de dificultad en el mapeo y la secuenciación genética. La determinación de la secuencia de *C. elegans* en 1998 representó, por tanto, un hito importante en el análisis genómico, que extendió la secuenciación genómica desde los organismos unicelulares (bacterias y levaduras) a un organismo multicelular reconocido como modelo importante del desarrollo animal.

Las fases iniciales del análisis del genoma de *C. elegans* se utilizaron fragmentos de ADN clonados en cósmidos, que situaron inserciones de ADN de unas 40 kb (véase Fig. 3.23). Este paso, sin embargo, no fue capaz de cubrir el genoma completo, con lo que fue sustituido por la clonación de piezas de ADN mucho más largas en vectores de **cromosomas artificiales de levaduras** (**YAC**; del inglés, *yeast artificial chromosome*) (Fig. 4.23). La única característica de los YAC, es que contienen centrómeros y telómeros, permitiendo su replicación como cromosomas lineales en levaduras.

Se pueden utilizar, por tanto, para clonar fragmentos de ADN del tamaño del ADN cromosómico de las levaduras-miles de kilobases de longitud. Las inserciones de largos fragmentos de ADN clonados en los YACs son esenciales en el mapeo de genomas complejos.

El genoma *de C. elegans* comprende 97 × $10^6$ pares de bases y contiene 19.099 supuestas secuencias codificadoras de proteínas-aproximadamente tres veces el número de genes en levaduras y un quinto del número de genes calculado en humanos. Al contrario de la organización compacta del genoma de levaduras, los genes en *C. elegans* se extienden unas 5 kilobases y contienen una media de cinco intrones. Las secuencias codificadoras de proteínas representan, por tanto, solamente el 25 % del genoma de *C. elegans*, comparado con el 70 % de las levaduras y cerca del 90 % de los genomas bacterianos.

Aproximadamente el 40 % de las supuestas proteínas de *C. elegans* muestra similitudes significativas con las proteínas conocidas de otros organismos. Como se esperaba, existen más similitudes entre las proteínas de *C. elegans* y de los humanos que entre *C. elegans* y las levaduras o bacterias. Las proteínas que son comunes entre *C. elegans* y levaduras podrían funcionar en los procesos celulares básicos compartidos por estos organismos, como el metabolismo,

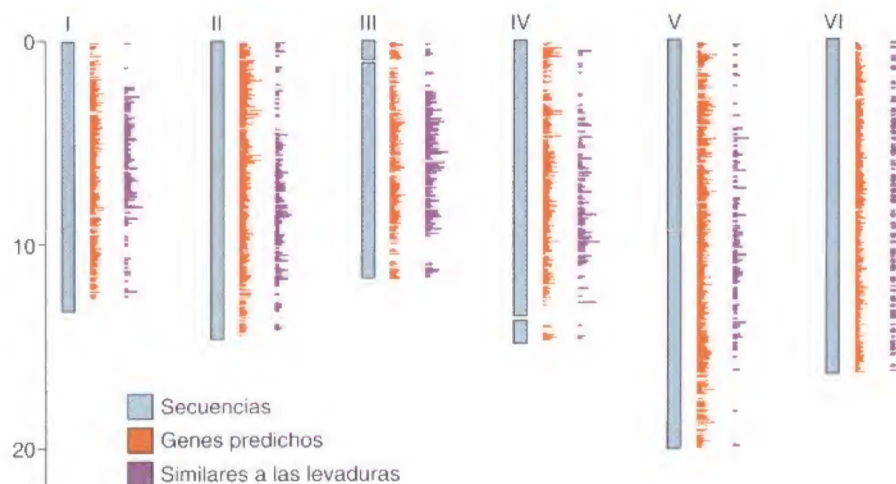



*Figura 4.25*
**El genoma de *C. elegans*.** Las posiciones predichas de los genes de *C. elegans* sobre cada cromosoma están indicadas por barras rojas. Aquellas que son similares a los genes de levaduras se indican en violeta. (De The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. *Science* 282:2012.)

replicación del ADN, transcripción, traducción y clasificación de proteínas. Estos procesos biológicos esenciales parecen estar llevados a cabo por un número parecido de genes en ambos organismos, siendo posible que estos genes sean compartidos por todas las células eucariotas. Por el contrario, la mayoría de los genes de *C. elegans* no se encuentran en levaduras y funcionan en las actividades reguladoras más complicadas necesarias para el desarrollo de los organismos multicelulares. El descubrimiento de estos genes parece ser particularmente excitante en términos del conocimiento del desarrollo animal. Aunque los adultos de la especie *C. elegans* tienen una longitud aproximada de 1 mm y contienen solamente 959 células somáticas en el cuerpo entero, presentan todas las células especializadas que se puedan encontrar en animales más complicados. Además, se ha descrito el patrón completo de las divisiones celulares que conducen al desarrollo de *C. elegans*, incluyendo el análisis de las conexiones hechas por 302 neuronas en el animal adulto. Muchos de los genes involucrados en el desarrollo y diferenciación de *C. elegans* se ha encontrado que están relacionados con genes implicados en el control de la diferenciación y proliferación de las células de los mamíferos, sustentando la validez de *C. elegans* como modelo de animales más complejos. Sin ninguna duda, los estudios de secuenciación del genoma de *C. elegans* seguirán descubriendo genes primordiales en el control del desarrollo celular.

*Drosophila* es otro modelo clave para el desarrollo animal, el cual ha sido descrito genéticamente en detalle. Las ventajas de *Drosophila* para el análisis genético incluyen su genoma relativamente simple y el hecho de que puede ser mantenida y criada en el laboratorio. Además, *Drosophila* aporta un instrumento especial para el análisis genético en los **cromosomas politénicos** gigantes que se encuentran en algunos tejidos como las glándulas salivares de la larva. Los cromosomas se forman en las células que no se dividen como consecuencia de la replicación repetitiva de las hebras de ADN que no se pueden separar la una de la otra. Por tanto, cada cromosoma politénico contiene cientos de moléculas de ADN idénticas alienadas en paralelo. Debido a su tamaño, estos cromosomas politénicos son visibles al microscopio óptico, y con técnicas de tinción apropiadas se puede distinguir un patrón de bandas (Fig. 4.26). El bandeo de los cromosomas politénicos proporciona un mayor grado de resolución que el obtenido por los cromosomas de metafase (p. ej., véase Fig. 4.17). Los cromosomas politénicos son cromosomas de interfase descondensados que contienen genes expresados activamente. Son visibles más de 5.000 bandas,



*Figura 4.26*
**Cromosomas politénicos en *Drosophila*.** Micrografía óptica de cromosomas teñidos de la glándula salivar. Los cuatro cromosomas (X, 2, 3 y 4) están unidos por sus centrómeros. (Peter J. Bryant/Biological Photo Service.)

cada una de ellas correspondiente a un tamaño aproximado de 20 kb de ADN. Por el contrario, las bandas identificadas en los cromosomas de metafase humanos contienen varias megabases de ADN.

El patrón de bandas de los cromosomas politénicos proporciona un mapa de alta resolución del genoma de *Drosophila*. La deleción de genes se puede relacionar con la pérdida de una banda cromosómica específica, definiendo por tanto la localización física del gen en el cromosoma. Además, los ADNs clonados pueden mapearse por hibridación *in situ* de los cromosomas politénicos, con frecuencia con una resolución suficiente para localizar los genes clonados en las bandas específicas (Fig. 4.27). Por tanto, las posiciones en el mapa de los clones de cósmidos o de los YACs (que ocupan muchas bandas) pueden determinarse con facilidad, proporcionando la base para el análisis de la secuencia genómica.

Debido al poder de la genética de *Drosophila*, la secuenciación completa del genoma de *Drosophila* al comienzo del año 2000 fue uno de los pasos más importantes en el análisis genómico. El genoma de *Drosophila* consiste en $180 \times 10^6$ pares de bases, de las que un tercio es heterocromatina. La heterocromatina consiste principalmente en repeticiones satélite de secuencia sencilla, además de elementos transponibles dispersos, y no se incluyó en la secuenciación genómica. Las restantes $120 \times 10^6$ pares de bases de eucromatina fueron secuenciadas empleando una combinación de clones de **cromosomas bacterianos artificiales (BAC)**, que portan grandes insertos de ADN, y un método de escopeta en el que pequeños fragmentos de ADN son clonados al azar y secuenciados en vectores plasmídicos. Las secuencias de estos pequeños fragmentos de ADN fueron organizadas a continuación en una larga secuencia contigua mediante la identificación de secuencias comunes entre fragmentos, y estas organizaciones de secuencias alineadas con los clones BAC para dar lugar a una secuencia completa de la porción eucromática del genoma de *Drosophila*.



*Figura 4.27*
**Hibridación *in situ* de un cromosoma politénico de *Drosophila*.** Se ilustra la hibridación de un clon de YAC con un cromosoma politénico. La región de la hibridación se indica con una flecha. (Cortesía de Daniel L. Hartl, Harvard University.)

El genoma de Drosophila contiene aproximadamente 13.600 genes, cantidad un tanto inferior al número de genes en *C. elegans*. Al igual que *C. elegans*, los genes de *Drosophila* contienen un promedio de 4 intrones, y la cantidad total de secuencias intrónicas es similar a la cantidad de secuencias exónicas. En total, las secuencias codificadoras de proteínas constituyen aproximadamente el 13% del genoma de *Drosophila*. A pesar de que *Drosophila* contiene menos genes que *C. elegans*, es importante notar que muchos de los genes se encuentran repetidos en ambos organismos. Cuando se tienen en cuenta estas duplicaciones, parece que el número de genes únicos es similar tanto en *Drosophila* como en *C. elegans* —entre 8.000 y 9.000—. Aproximadamente un 20% de los genes de *Drosophila* están relacionados con genes presentes tanto en levaduras como en *C. elegans* —las proteínas codificadas por estos genes pueden realizar funciones que son comunes a todas las células eucariotas—. Otros genes de *Drosophila* están relacionados con genes encontrados en *C. elegans* pero no en levaduras, mientras que otros genes son exclusivos de *Drosophila*.

Resulta especialmente llamativo que un animal complejo como *Drosophila* sólo contenga aproximadamente el doble de genes únicos que los encontrados en las levaduras, que parece un organismo mucho más sencillo. Aparentemente, la complejidad de los organismos multicelulares no está simplemente relacionada con un mayor número de genes. Parte del incremento en complejidad biológica de *Drosophila* y *C. elegans* puede deberse al hecho de que sus proteínas son en general más grandes y contienen más dominios funcionales que las proteínas de levaduras. Más estudios y análisis funcionales de los genes que se han descubierto mediante la secuenciación de los genomas de *Drosophila* y *C. elegans* jugarán un papel muy importante en la comprensión de las formas en que estos genes actúan para dirigir el complejo proceso del desarrollo animal.

### Genomas de plantas

Al completar la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* en el año 2000 se extendió la secuenciación genómica de los animales a los vegetales, y fue,

por tanto, un hecho muy importante en la biología vegetal. *Arabidopsis thaliana* es una planta sencilla, fanerógama, ampliamente utilizada como modelo en estudios de biología molecular y del desarrollo de plantas. Sus ventajas como organismo modelo para la biología molecular y la genética incluyen su genoma relativamente pequeño de aproximadamente $125 \times 10^6$ pares de bases, similar en tamaño a los genomas de *C. elegans* y *Drosophila*. Al igual que el genoma de *Drosophila*, el genoma de *Arabidopsis* fue secuenciado principalmente mediante el uso de vectores BAC para acomodar grandes insertos de ADN.

Sorprendentemente, el análisis del genoma de *Arabidopsis* indicaba que contenía aproximadamente 26.000 genes codificantes de proteína —significativamente más genes que los encontrados en *C. elegans* o en *Drosophila*—. Sin embargo, este número inesperadamente elevado de genes no refleja una mayor diversidad de proteínas codificadas por el genoma de *Arabidopsis*. Por el contrario, parece que el elevado número de genes de *Arabidopsis* es el resultado de duplicaciones de grandes segmentos del genoma de *Arabidopsis*. Estas duplicaciones implican aproximadamente a un 60% del genoma, de modo que el número de genes codificantes de proteína diferentes en *Arabidopsis* se estima en torno a unos 15.000 —similar al número de genes en *C. elegans* o *Drosophila*.

La densidad génica de *Arabidopsis* también es similar a la de *C. elegans*, con secuencias codificantes de proteína responsables de aproximadamente el 25% del genoma de *Arabidopsis*. Como media, los genes de *Arabidopsis* tienen aproximadamente 4 intrones, y la longitud total de las secuencias intrónicas es aproximadamente igual a la longitud total de las secuencias exónicas. Los elementos transponibles constituyen un 10% del genoma de *Arabidopsis*. Al igual que en *Drosophila*, las repeticiones de elementos transponibles se encuentran agrupadas en los centrómeros junto con las secuencias repetitivas satélite.

Un análisis comparativo de las funciones de los genes de *Arabidopsis* ha revelado tanto similitudes como diferencias interesantes entre los genes de animales y plantas. Los genes de *Arabidopsis* implicados en procesos celulares fundamentales como la replicación del ADN, reparación, transcripción, traducción y tráfico de proteínas son similares a los de las levaduras, *C. elegans* y *Drosophila* reflejando el origen evolutivo común de todas las células eucarióticas. Por el contrario, los genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas implicadas en procesos como la señalización celular y el transporte de membrana son bastante diferentes de los de las células animales, lo que es paralelo a las grandes diferencias en cuanto a fisiología y desarrollo entre animales y plantas. Aproximadamente una tercera parte de todos los genes de *Arabidopsis* parecen ser exclusivos de las plantas, ya que no se encuentran en los genomas de levaduras y animales. El grupo funcional mayor de genes de *Arabidopsis*, correspondiente a un 22% del genoma, codifica proteínas implicadas en el metabolismo y la fotosíntesis (Fig. 4.28). Otro grupo grande de genes (12% del genoma) codifican proteínas implicadas en las defensas de la planta. También resulta notable el hecho de que *Arabidopsis* codifica más de 3.000 proteínas que regulan la transcripción (correspondiendo a un 17% del genoma). Este número de proteínas reguladoras génicas (factores de transcripción) es dos o tres veces superior al encontrado en *Drosophila* y *C. elegans*, respectivamente. Muchos de los factores de transcripción de *Arabidopsis* son exclusivos para plantas, reflejando presumiblemente las características distintas de la expresión génica en el desarrollo de las plantas y en la respuesta de las plantas a su entorno.

La secuencia de *Arabidopsis* fue seguida, en el año 2002, por la publicación de las secuencias borrador del genoma del arroz. El arroz es de gran importancia como cereal de cultivo, y es el alimento base de más de la mitad de la población mundial, de modo que la secuenciación del genoma del arroz posee el potencial de conllevar aplicaciones muy significativas en la agricultura y biotecnología. Dos grupos de investigación han descrito secuencias borrador de los genomas de dos subespecies de arroz: la subespecie *indica*, que es la subespe-

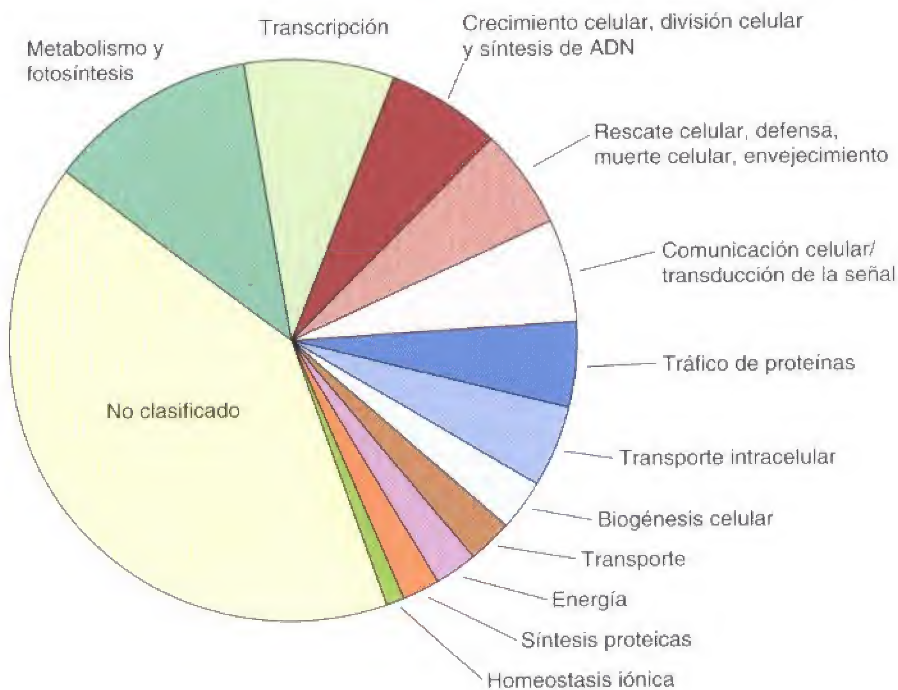



*Figura 4.28*
**Funciones de los genes predichos de *Arabidopsis thaliana*.** El diagrama ilustra la proporción de *Arabidopsis* en diferentes categorías funcionales. (De The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000. *Nature* 408:796.)

cie más ampliamente cultivada en China y la mayor parte del resto de Asia; y la subespecie *japonica*, que es la variedad preferida en Japón. A pesar de que ambas secuencias genómicas se encuentran actualmente en borradores en lugar de en su forma completa, con muchos huecos en las secuencias que deben ser rellenados, proporcionan una gran cantidad de información útil.

El genoma del arroz consiste en unas $440 \times 10^6$ pares de bases de ADN —casi 4 veces mayor que el genoma de *Arabidopsis*. Aproximadamente un 45% del genoma del arroz consiste en secuencias repetitivas, incluidas repeticiones de secuencia sencilla y elementos transponibles. Las estimaciones del número de genes del borrador del genoma del arroz varían entre 32.000 y 50.000. Estas estimaciones difieren entre grupos de investigación, y serán pulidas tras un mayor análisis. De todos modos, parece que el genoma del arroz contiene más genes que *Arabidopsis*, y posiblemente más genes de los que están presentes en el genoma humano. Al igual que *Arabidopsis*, el arroz contiene muchos genes duplicados (más del 70%), que pueden haber surgido como resultado de la duplicación de grandes segmentos del genoma. Curiosamente, más del 80% de los genes identificados en *Arabidopsis* también se encuentra en el arroz. Muchos de los genes compartidos entre *Arabidopsis* y el arroz no se encuentran en genomas de levaduras ni animales y, por lo tanto, parecen ser específicos de plantas. Además, muchos de los genes predichos en el arroz no poseen equivalentes en *Arabidopsis*, aunque todavía debe determinarse si estos genes «predichos» de hecho codifican proteínas. A pesar de que siguen existiendo muchas preguntas, se espera que la compleción y análisis continuado de la secuencia del genoma del arroz contribuya no sólo a nuestra comprensión de la biología de plantas, sino también a mejoras en la producción de cereales que ayudará en la lucha contra el hambre mundial.

### *Genoma humano*

Para muchos científicos, el objetivo final del análisis genómico era la determinación de la secuencia completa de nucleótidos del genoma humano: aproximadamente $3 \times 10^9$ pares de bases de ADN. Para comprender la magnitud de este objetivo, recuerde que el genoma humano es más de diez veces mayor que el

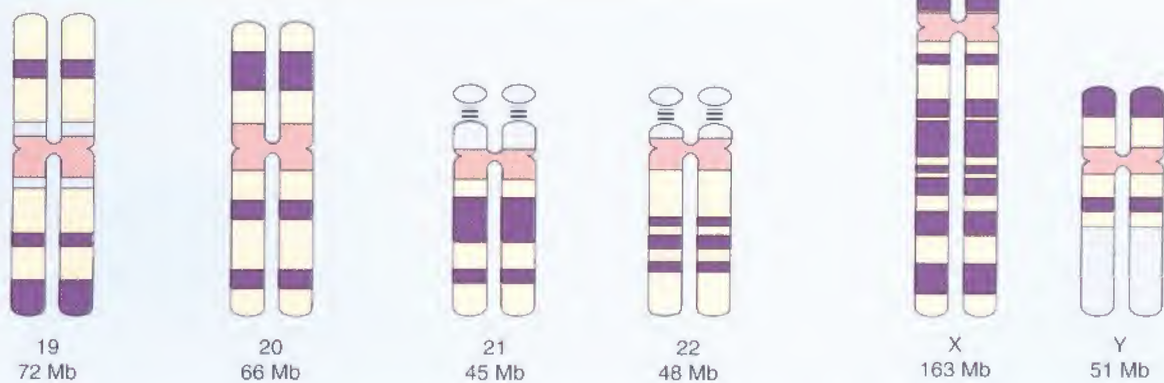



*Figura 4.29*
**Cromosomas humanos.** Esquema de los cromosomas de metafase humanos mostrando el patrón de bandas obtenido después de la tinción citogenética.

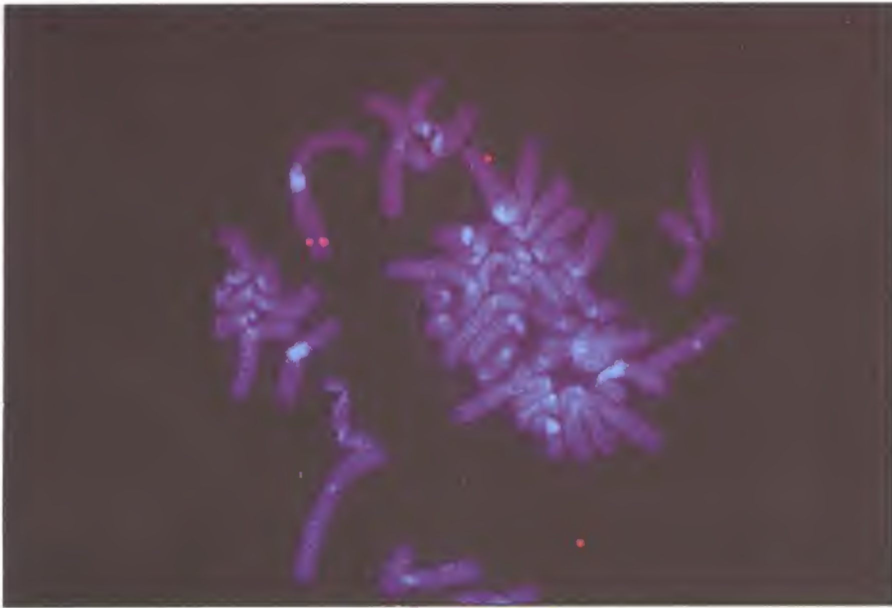


*Figura 4.30*
**Hibridación fluorescente *in situ*.** Una sonda fluorescente del gen que codifica el receptor de la lámina B se hibrida con cromosomas humanos de metafase teñidos (azul). Las señales de hibridación de los genes simples son detectadas como fluorescencia roja. (Cortesía de K. L. Wydner y J. B. Lawrence, University of Massachusetts Medical Center.)

de *Drosophila*; que el cromosoma humano más pequeño es varias veces superior al genoma completo de levaduras; y que la longitud extendida del ADN que compone el genoma humano es de aproximadamente 1 m de largo. Partiendo de todas estas perspectivas, la determinación de la secuencia del genoma humano fue un trabajo fenómeno, y su publicación en forma de borrador en el año 2001 se ha considerado como un logro científico de magnitud histórica.

El genoma humano se distribuye a lo largo de 24 cromosomas (22 autosomas y 2 cromosomas sexuales), donde cada uno contiene entre 45 y 280 Mb de ADN (Fig. 4.29). Antes de la determinación de la secuencia del genoma, varios miles de genes humanos habían sido identificados y mapeados en posiciones de los cromosomas humanos. Un método empleado con frecuencia para localizar genes es la hibridación *in situ* de sondas marcadas con colorantes fluorescentes a los cromosomas —un método generalmente denominado **hibridación de fluorescencia *in situ***, o **FISH** (*fluorescent in situ hybridization*) (Fig. 4.30). La hibridación *in situ* a los cromosomas en metafase permite el mapeo de un gen clonado a un locus definido mediante una banda cromosómica. Ya que cada banda de los cromosomas metafásicos humanos contiene miles de kilobases de ADN, la hibridación *in situ* a cromosomas metafásicos humanos no proporciona la información de mapeo detallada obtenida con los cromosomas politénicos de *Drosophila*, que permite la localización de los genes a bandas de cromosomas en interfase que contienen sólo de 10 a 20 kb de ADN. Sin embargo, puede obtenerse una mayor resolución mediante la hibridación a cromosomas humanos más extendidos de células en prometafase o en interfase, permitiendo el uso de la hibridación *in situ* para mapear genes clonados a regiones de unas 100 kb. Además del FISH, el análisis de ligamiento genético y el mapeo físico de secuencias genómicas clonadas y ADNc fueron utilizados para determinar los mapas físicos y genéticos del genoma humano. En 1996, los marcadores correspondientes a aproximadamente 30.000 genes habían sido localizados en cromosomas humanos, estableciendo una base para la secuenciación genómica (Fig. 4.31).

Las secuencias borrador del genoma humano publicadas en el 2001 fueron producidas por dos grupos independientes de investigación. El Internacional Human Genome Sequencing Consortium empleó clones de BAC que habían sido mapeados a sitios sobre los cromosomas humanos como sustratos para la secuenciación. El otro, dirigido por Craig Venter de Celera Genomics, empleó un método de escopeta en el que se clonaron y secuenciaron pequeños frag-

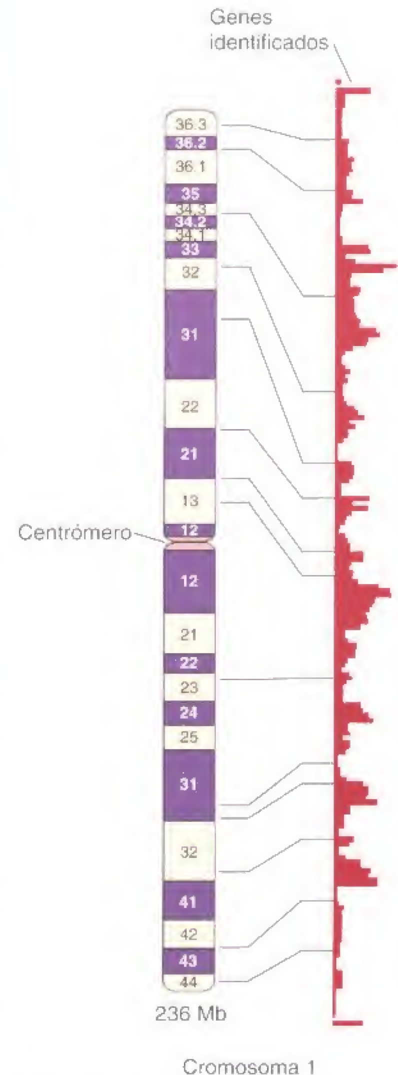
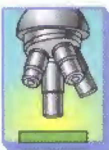



*Figura 4.31*
**Mapa transcrito del cromosoma 1 humano.** Los marcadores STS de los clones de ADNc que representan unos 30.000 genes humanos han sido mapeados en los cromosomas humanos. Se muestra un mapa representativo del cromosoma 1. El histograma de la derecha ilustra la distribución de los genes a lo largo del cromosoma. (De Genome Maps 7, 1996. *Science* 274: 547.)



Experimento clave

# El genoma humano

**Secuenciación Inicial y Análisis del Genoma Humano**
Internacional Human Genome Sequencing Consortium
*Nature*, Volumen 409, 2001, págs 860-921

**La Secuencia del Genoma Humano**
J. Craig Venter y otros 273
*Science*, Volumen 291, 2001, págs 1304-1351

## Contexto

La idea de secuenciar por completo el genoma humano fue concebida en primer lugar a mediado de los años 80. Inicialmente recibió un amplio escepticismo entre los biólogos, la mayoría de los cuales pensaban que no era un proyecto factible. En ese momento, el genoma más grande que se había secuenciado por completo era el del virus de Epstein-Barr, que alcanzaba un total de aproximadamente 180.000 pares de bases de ADN. Desde esta perspectiva, la secuenciación del genoma, que era unas 20.000 veces más grande, parecía inconcebible para muchos. Sin embargo, la idea de un proyecto tan grande en biología captó la imaginación de otros, incluyendo a Charles DeLisi, quien estaba en ese momento al mando de la Oficina de Salud e Investigación Medioambiental en el Departamento de Energía. En 1986, DeLisi consiguió lanzar la Iniciativa del Genoma Humano como un proyecto del Departamento de Energía.

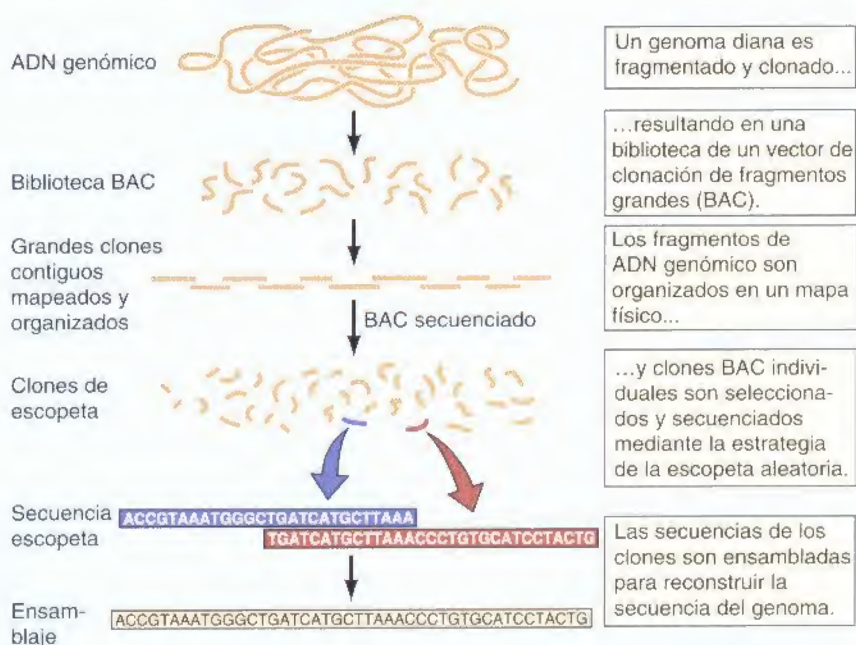
El proyecto obtuvo mayor apoyo en 1988, cuando fue apoyado por un comité del Consejo Nacional de Investigación. Este comité recomendaba un mayor esfuerzo, incluyendo la secuenciación de genomas de varios organismos modelo y el desarrollo paralelo de mapas genéticos y físicos de los cromosomas humanos. Este esfuerzo se centró en los Institutos Nacionales de Salud, inicialmente bajo la dirección de James Watson (codescubridor de la estructura del ADN), y después bajo el liderazgo de Frances Collins.

El primer genoma completo que se secuenció fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*, reportado por Craig Venter y sus colaboradores en 1995.Venter había formado parte del proyecto de secuenciación genómica en los Institutos Nacionales de Salud, pero había pasado a dirigir una compañía sin ánimo de lucro, El Instituto para la Investigación Genómica, en 1991. Durante este tiempo, se había conseguido un progreso considerable en el mapeo del genoma humano, y la secuencia inicial de *H. influenzae* fue seguida de las secuencias de otras bacterias, levaduras y *C. elegans* en 1998.

En 1998, Venter formó una nueva compañía, Celera Genomics, y anunció sus planes de emplear tecnologías avanzadas de secuenciación para obtener la secuencia completa del genoma humano en 3 años. Collins y otros líderes del proyecto genoma financiados con fondos públicos respondieron acelerando sus esfuerzos, resultando en una carrera que finalmente dio lugar a la publicación de dos secuencias borrador del genoma humano en febrero del 2001.

## Experimentos

Los dos grupos de científicos emplearon métodos diferentes para obtener la secuencia del genoma humano. El equipo financiado con fondos públicos, el Internacional Human Genome Sequencing Consortium, encabezado por Eric Lander, secuenció fragmentos de ADN derivados de clones BAC que

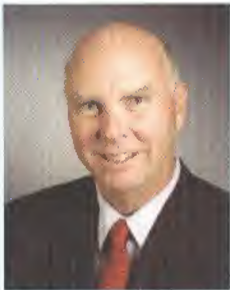



Estrategia para la secuenciación genómica mediante clones de BAC que habían sido organizados en grupos solapantes (contiguos) y mapeados a cromosomas humanos.

### *El genoma humano* (continuación)

habían sido previamente mapeados a cromosomas humanos, de forma similar al método empleado para determinar la secuencia de los genomas de levadura y *C. elegans* (ver figura). Por el contrario, el equipo de Celera Genomics empleó un método de secuenciación de escopeta con el genoma completo, que Venter y sus colaboradores habían empleado previamente para secuenciar el genoma de *H. influenzae*. En este método, los fragmentos de ADN se secuencian aleatoriamente, y las repeticiones entre fragmentos se emplearon para recomponer una secuencia del genoma completo. Ambas secuencias cubren sólo la porción de eucromatina del genoma humano—aproximadamente 2.900 Mb de ADN—con la porción rica en repeticiones de la heterocromatina del genoma (aproximadamente 300 Mb) permaneciendo sin secuenciar.

Es importante reconocer que ambas versiones publicadas inicialmente son borradores, en lugar de secuencias completadas. Existen huecos en la secuencia, de modo que los borradores publicados corresponden a aproximadamente el 90% de la secuencia de la porción de eucromatina del genoma. Además, algunos bloques de secuencia en los borradores pueden estar incorrectamente recompuestos. Sin embargo, las secuencias obtenidas de estos borradores se consideran muy precisas, de modo que proporcionan un gran recurso para la biología y la medicina.



Craig Venter



Eric Lander

#### Impacto

Inmediatamente surgieron muchas conclusiones importantes a partir de las secuencias del genoma humano. En primer lugar, el número de genes humanos parece estar entre 30.000 y 40.000 —sustancialmente menor que la predicción anterior de 100.000—. Resulta interesante que el procesamiento alternativo parece ser frecuente en el genoma humano, de modo que cada gen puede codificar una media de tres proteínas diferentes. Los intrones constituyen en torno al 25% del genoma humano, y las secuencias repetitivas un 60%. Es notable que más del 40% del ADN humano está compuesto por secuencias derivadas de la transcripción inversa, lo que resalta la importancia de este modo de transferencia de información en la formación de nuestro genoma.

Más allá de estas conclusiones inmediatas, la secuencia del genoma humano, junto con las secuencias genómicas de otros organismos, proporcionará una nueva base para la biología y medicina en los años venideros. El impacto de la secuencia genómica se sentirá en el descubrimiento de nuevos genes y sus funciones, la comprensión de la regulación génica, descubrir la base de enfermedades humanas y desarrollar nuevas estrategias para la prevención y tratamiento basados en el fondo genético de los individuos. El conocimiento del genoma humano puede en última instancia contribuir a alcanzar lo que Venter y sus colaboradores denominan «El verdadero reto de la biología humana... explicar cómo nuestras mentes han llegado a organizar suficientemente sus pensamientos para investigar nuestra propia existencia.»

mentos, y las partes repetidas entre segmentos fueron empleadas para organizar la secuencia del genoma. Ambas secuencias eran inicialmente borradores incompletos, en los que aproximadamente el 90% de la porción de eucromatina del genoma se había secuenciado y organizado. Los esfuerzos posteriores han cerrado los vacíos de las secuencias borrador, dando lugar a la compleción de una secuencia del genoma humano de alta calidad en el año 2003.

La porción de eucromatina genómica secuenciada incluye aproximadamente $2{,}9 \times 10^6$ kb de ADN (Fig. 4.32). El tamaño total del genoma es de aproximadamente $3{,}2 \times 10^6$ kb, donde el 10% restante del genoma ($0{,}3 \times 10^6$ kb) corresponde a secuencias altamente repetidas de la heterocromatina. Como se ha descrito antes en este capítulo, las secuencias repetitivas dispersas, la mayoría de las cuales son elementos transponibles que se han desplazado por el genoma mediante la transcripción inversa de intermediarios de ARN, forman aproximadamente el 45% de la secuencia de eucromatina humana. Otro 5% del genoma consiste en segmentos duplicados de ADN, de modo que en torno al 60% del genoma humano consiste en secuencias repetitivas de ADN.

Una gran sorpresa obtenida de las secuencias genómicas fue el número inesperadamente bajo de genes humanos. El genoma humano parece contener sólo 30.000-40.000 genes, lo que es bastante inferior a estimaciones anteriores

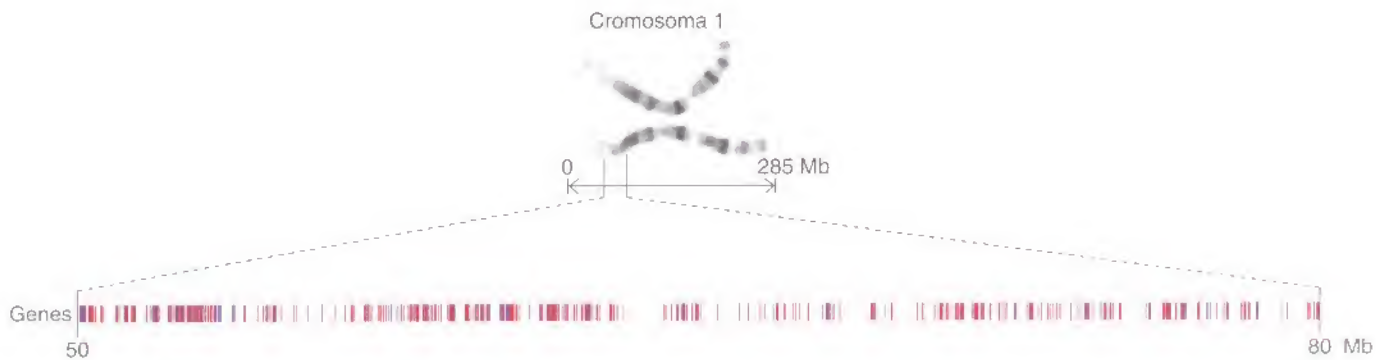



*Figura 4.32*
**Secuencia del cromosoma 1 humano.** Se indican las posiciones de los genes identificados en la secuencia borrador del cromosoma 1 humano. (De Internacional Human Genome Sequencing Consortium, 2001. *Nature* 409:860.)

de aproximadamente 100.000 genes en el genoma humano. Por el contrario, parece que los humanos sólo poseen en torno al doble del número de genes que animales más sencillos como *C. elegans* o *Drosophila*. De hecho, los humanos pueden tener menos genes que el arroz, lo que da énfasis a una de las principales conclusiones que ha surgido como resultado de la secuenciación genómica: la complejidad biológica de un organismo no es simplemente una función del número de genes en su genoma. Por otro lado, parece existir una gran cantidad de procesamiento alternativo en los genes humanos, permitiendo a un solo gen especificar más de una proteína (véase Fig. 4.5). Del análisis hasta la fecha, parece que el procesamiento alternativo puede resultar en la formación de tres o más ARNm a partir de un gen humano promedio. Como resultado, los 30.000-40.000 genes humanos estimados codifican 100.000 o más proteínas diferentes. El procesamiento alternativo también tiene lugar en *C. elegans* y en *Drosophila*, pero es mucho menos frecuente que en el humano. El predominio del procesamiento alternativo en humanos puede, por lo tanto, conllevar la formación de aproximadamente cinco veces el número de proteínas distintas en humanos que en *C. elegans* o en *Drosophila*.

Los genes humanos se extienden sobre distancias mucho mayores y contienen más secuencias intrónicas que los genes de *Drosophila* y *C. elegans*. La secuencia codificadora de proteína media en los genes humanos es de aproximadamente 1.400 pares de bases, semejante a los de *Drosophila* o *C. elegans*. Sin embargo, el gen humano medio abarca unas 30 kb de ADN, donde más del 90% corresponde a intrones. Así, aproximadamente el 25% del genoma consiste en intrones, y sólo del 1 al 1,5% del genoma humano corresponde a secuencias codificadoras de proteínas.

Más del 40% de las proteínas humanas predichas están relacionadas con proteínas de otros organismos secuenciados, incluyendo a *Drosophila* y *C. elegans*. Muchas de estas proteínas conservadas funcionan en procesos celulares básicos, como el metabolismo, replicación y reparación del ADN, transcripción, traducción y tráfico proteico. La mayoría de las proteínas que son exclusivas del hombre se componen de dominios proteicos que también se encuentran en otros organismos, pero estos dominios se organizan en nuevas combinaciones para dar lugar a proteínas diferentes en humanos. Comparado con *Drosophila* y *C. elegans*, el genoma humano contiene números expandidos de genes implicados en funciones relacionadas con la mayor complejidad de los vertebrados, como la respuesta inmune, el sistema nervioso y la coagulación sanguínea, además de una elevación del número de genes implicados en el desarrollo, señalización celular y regulación de la transcripción.

La secuencia del genoma humano, junto con las secuencias de otros genomas, proporciona una riqueza de información que forma un nuevo marco para los estudios de biología celular y molecular. Tal y como se evidenciará en los capítulos sucesivos, nuevos genes implicados en muchos procesos celulares podrán identificarse mediante el análisis de la secuencia genómica y su compa-

ración con las secuencias de otros organismos. La exploración de las funciones de estos genes, al igual que de muchos genes nuevos descubiertos por la secuenciación genómica, formará la base de muchos estudios de función celular en los próximos años. La disponibilidad de la secuencia del genoma humano también tendrá grandes aplicaciones ayudando a descubrir nuevos genes implicados en muchas enfermedades que afligen a la humanidad, incluyendo el cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades degenerativas del sistema nervioso, como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer.

Descifrar la secuencia del genoma humano revelará no sólo las secuencias codificantes de proteína de los genes, sino también las secuencias reguladoras que controlan la expresión génica. Tal y como se analiza en capítulos sucesivos, la regulación de la expresión génica es crítica para muchos aspectos de la función celular, incluyendo el desarrollo de los organismos multicelulares complejos. La comprensión de los mecanismos que controlan la expresión génica es un gran reto de la biología celular y molecular contemporánea, y se espera que la disponibilidad de secuencias genómicas contribuyan considerablemente a este trabajo. Desgraciadamente, actualmente es mucho más difícil identificar las secuencias reguladoras génicas que las secuencias codificadoras de proteínas, especialmente en genomas grandes como el humano. Probablemente dichos estudios estarán facilitados por la comparación de secuencias genómicas de organismos relacionados. Por ejemplo, la secuencia recientemente completada del genoma del ratón indica, como se esperaba, una gran cantidad de conservación entre las secuencias codificadoras de proteínas del humano y el ratón. Una conservación parecida de las secuencias reguladoras génicas puede ayudar a determinar dichas secuencias y comprender su función.

La disponibilidad de secuencias genómicas adicionales de especies estrechamente relacionadas también nos permitirá estudiar la base de las diferencias entre especies. Por ejemplo, pronto podremos comparar el genoma humano no sólo con el de invertebrados como *Drosophila* o *C. elegans*, sino también con el de otros mamíferos, como el ratón, y con otros primates, como el chimpancé. Adicionalmente, podremos comparar las secuencias de diferentes individuos entre sí. Los genomas de humanos individuales se diferencian en una de cada mil bases. El análisis de estas variaciones entre individuos permitirá asociar genes específicos con la susceptibilidad a ciertas enfermedades, y permitirá a los médicos elaborar estrategias para prevenir y tratar enfermedades específicas para el fondo genético de pacientes individuales. La comparación entre genomas de diferentes individuos también puede ayudar a elucidar la contribución de nuestros genes a otras características únicas, como la capacidad atlética o la inteligencia, y a comprender mejor las interacciones entre los genes y el ambiente que desencadena los complejos comportamientos humanos.

## RESUMEN

### COMPLEJIDAD DE LOS GENOMAS EUCARIOTAS

***Intrones y exones***: La mayoría de los genes eucariotas presentan una estructura dividida en la que los segmentos de secuencias codificadoras o codificantes (exones) están interrumpidas por secuencias no codificadoras (intrones). En los eucariotas complejos, los intrones representan unas diez veces más ADN que los exones.

***Secuencias repetitivas de ADN***: Aproximadamente el 40 % del ADN de los mamíferos consiste en secuencias de ADN altamente repetitivas, algunas de las cuales están presentes en $10^5$ y $10^6$ copias por genoma. Estas secuencias incluyen las repeticiones de secuencia sencilla y los elementos repetitivos que se han desplazado a través del genoma mediante intermediarios de ARN o ADN.

## PALABRAS CLAVE

**Gen, secuencia espacial, exón, intrón empalme o *splicing* del ARN, kilobase (kb), procesamiento alternativo**

**Repetición de secuencia sencilla, ADN satélite, SINE, LINE, retrotransposones, transposón de ADN**

Familia génica, pseudogén, pseudogén procesado

***Duplicación génica y pseudogenes:*** Muchos genes eucarióticos están presentes en múltiples copias, denominadas familias génicas, que han surgido por duplicación de genes ancestrales. Algunos miembros de las familias génicas funcionan en tejidos diferentes o durante distintas fases del desarrollo. Otros miembros de las familias génicas (pseudogenes) han sido inactivados por mutaciones y ya no representan genes funcionales. Las duplicaciones génicas pueden ocurrir tanto por duplicación de un segmento de ADN como por transcripción inversa de un ARNm, dando lugar a un pseudogén procesado. Aproximadamente el 5% del genoma humano consiste en segmentos de ADN duplicados. Adicionalmente, se estima que existen varios miles de pseudogenes procesados en el genoma humano.

***Composición de los genomas de los eucariotas superiores:*** Sólo una pequeña fracción del genoma en los eucariotas complejos corresponde a secuencias codificadoras de proteína. El genoma humano se estima que contiene 30.000-40.000 genes, donde la secuencia codificadora de proteína corresponde solamente al 1-1,5% del ADN. Aproximadamente el 25% del genoma humano consiste en intrones, y más del 60% está compuesto por secuencias de ADN repetitivas y duplicadas.

## CROMOSOMAS Y CROMATINA

Cromatina, histona, nucleosoma, partícula central del nucleosoma, cromatosoma, eucromatina, heterocromatina

***Cromatina***: El ADN de las células eucariotas se encuentra envuelto por histonas que forman nucleosomas. La cromatina se puede compactar aún más mediante el plegamiento de los nucleosomas en estructuras altamente ordenadas, incluyendo la condensación de los cromosomas en metafase de las células entrando en mitosis.

Centrómero, cinetocoro

***Centrómeros***: Los centrómeros son regiones especializadas de los cromosomas eucariotas que sirven como sitios de asociación entre las cromátidas hermanas y como sitios de adhesión de las fibras del huso durante la mitosis.

Telómero

***Telómeros***: Los telómeros son secuencias especializadas necesarias para el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

Bioinformática

## SECUENCIAS DE GENOMAS COMPLETOS

Megabase (Mb), marco abierto de lectura o fase de lectura abierta

***Genomas procariotas***: Los genomas de cerca de una docena de bacterias, incluyendo *E. coli*, ya han sido completamente secuenciadas. El genoma de *E. coli* contiene 4.288 genes, con secuencias codificadoras de proteínas que representan casi el 90 % del ADN.

***Secuenciación del genoma de levaduras***: El primer genoma eucariota en ser secuenciado fue el de *S. cerevisiae*. El genoma de las levaduras contiene unos 6.000 genes, y las secuencias codificadoras de proteínas representan aproximadamente el 70 % del genoma. El genoma de la levadura de fisión *S. pombe* contiene menos genes (unos 5.000) y más intrones que *S. cerevisiae*, donde la secuencia codificadora de proteínas corresponde a aproximadamente el 60% del genoma de *S. pombe*.

Cromosoma artificial de levaduras (YAC), cromosoma politénico, cromosoma artificial bacteriano (BAC)

***Genomas de* Caenorhabditis elegans *y* Drosophila melanogaster:** El genoma de *C. elegans* fue el primer genoma secuenciado de un organismo multicelular. El genoma de *C. elegans* contiene unas 19.000 secuencias codificadoras de proteína, que corresponden solamente al 25% del genoma. El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 13.600 genes, con secuencias codificadoras de proteína correspondiendo al 13% del genoma. A pesar de que *Drosophila* contiene menos genes que *C. elegans*, muchos genes en ambas especies están duplicados, y parece que ambas especies contienen de 8.000 a 9.000 genes únicos. Algunos de estos genes están

compartidos por *Drosophila* y *C. elegans*, y levaduras —estos genes pueden codificar proteínas con funciones comunes a todas las células eucariotas. Sin embargo, la mayoría de los genes de *Drosophila* y *C. elegans* no se encuentran en levaduras y probablemente funcionan en la regulación y desarrollo de los animales multicelulares.

***Genomas de plantas:*** El genoma de la pequeña planta angiosperma *Arabidopsis thaliana* contiene aproximadamente 26.000 genes —curiosamente más genes de los encontrados en *Drosophila* o en *C. elegans*. Sin embargo, muchos de estos genes son el resultado de duplicaciones de grandes segmentos del genoma de *Arabidopsis*, de modo que el número de genes únicos en *Arabidopsis* es de unos 15.000. Muchos de estos genes son exclusivos de plantas, incluyendo genes implicados en la fisiología, desarrollo y defensa de la planta. La secuencia del genoma del arroz es de especial interés para la agricultura porque el arroz es el alimento base de más de la mitad de la población mundial. La secuencia borrador del genoma del arroz estima que contiene entre 30.000 y 50.000 genes, muchos de los cuales están duplicados y pueden haber surgido por la duplicación de grandes segmentos del genoma.

***El genoma humano:*** El genoma humano parece contener 30.000-40.000 genes —sólo el doble del número de genes encontrados en animales más sencillos como *Drosophila* o *C. elegans*. Sin embargo, el procesamiento alternativo parece ser frecuente en el humano, y puede resultar en la producción de tres o más ARNm (y proteínas) a partir de un gen promedio. Más del 40% de las proteínas humanas predichas están relacionadas con proteínas encontradas en otros organismos secuenciados, incluyendo *Drosophila* y *C. elegans*. Además, el genoma humano contiene números expandidos de genes implicados en el sistema nervioso, el sistema inmune, la coagulación sanguínea, el desarrollo, la señalización celular y la regulación de la expresión génica.

**Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)**

## Preguntas

**1.** Muchos organismos poseen tamaños de genoma que son mucho mayores de lo que su complejidad parece requerir. Explica esta paradoja.

**2.** ¿Cómo fueron descubiertos los intrones y exones durante los estudios de ARNm de adenovirus?

**3.** ¿Cuál es la importancia del procesamiento alternativo?

**4.** ¿Cómo puede separarse el ADN repetitivo de secuencia sencilla del resto del ADN nuclear?

**5.** ¿Cuál es la diferencia entre un centrómero y el cinetócoro?

**6.** Los centrómeros de levaduras forman un cinetócoro que se une a un solo microtúbulo, mientras que la mayoría de los animales poseen cinetócoros que se unen a unos 20 microtúbulos del huso. ¿Cómo se reflejan estas diferencias en la estructura de sus centrómeros?

**7.** ¿Cuáles son las dos funciones principales de los telómeros en los cromosomas?

**8.** Cuando se introduce una secuencia centromérica en un plásmido circular y se inserta en levaduras, sus genes se reproducen y segregan con normalidad en cada división celular; pero cuando se corta en un punto con una endonucleasa de restricción para crear un cromosoma lineal, los genes plasmídicos se pierden rápidamente por parte de las levaduras. Explícalo. ¿Qué experimento adicional realizarías para confirmar tu explicación hipotética?

**9.** ¿Qué es un marco de lectura abierta y cuál es su importancia en el análisis genómico?

**10.** ¿Cuánta diferencia existe entre las secuencias genómicas de individuos humanos?

**11.** Las secuencias repetitivas de ADN se identificaron por primera vez mediante estudios del cálculo de la reasociación del ADN. ¿Cuáles son los cálculos relativos de reasociación esperados para secuencias repetidas 1.000 veces en el genoma comparados con los genes con una sola copia?

**12.** Aproximadamente se han localizado 30.000 ADNc en el mapa del genoma humano. ¿Cuál es la distancia media entre estos marcadores?

## Bibliografía


### *Complejidad de los genomas eucariotas*

Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3171-3175. [P]

Breathnach, R., J. L. Mandel and P. Chambon. 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* 270: 314-319. [P]

Britten, R. J. and D. E. Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540. [P]

Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220. [R]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrange ment at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1-8. [P]

Fritsch, E. F., R. M. Lawn and T. Maniatis. 1980. Molecular cloning and characterization of the human b-like globin gene cluster. *Cell* 19: 959-972. [P]

Gilbert, W. 1985. Genes-in-pieces revisited. *Science* 228: 823-824. [R]

Gilbert, W., S. J. de Souza and M. Long. 1997. Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7698-7703. [R].

Henikoff, S., E. A. Greene, S. Pietrokovski, P. Bork, T. K. Attwood and L. Hood. 1997. Gene families: The taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278: 609-614. [R]

Hentschel, C. C. and M. L. Birnsteil. 1981. The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25: 301-313. [R]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Kazazian, H. H., Jr. 2000. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science* 289: 1152-1153. [R]

Kidwell, M. G. and D. Lisch. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711. [R]

Little, P. F. R. 1982. Globin pseudogenes. *Cell* 28: 683-684. [R]

Moran, J. V., R. J. DeBerardinis and H. H. Kazazian Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283: 1530-1534. [P]

Schmid, C. W. and W. R. Jelinek. 1982. The *Alu* family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216: 1065-1070. [R]

Stoltzfus, A., D. F. Spencer, M. Zuker, J. M. Logsdon, Jr. and W. F. Doolittle. 1994. Testing the exon theory of genes: The evidence from protein structure. *Science* 265: 202-207. [R]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. Weissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse b-globin gene is transcribed within the 15S b-globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1309-1313. [P]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351. [P]

### *Cromosomas y cromatina*

Blackburn, E. H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673. [R]

Carbon, J. 1984. Yeast centromeres: Structure and function. *Cell* 37: 351-353. [R]

Clarke, L. 1990. Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet.* 6: 150-154. [R]

Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504-509. [P]

Greider, C. W. 1999. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97: 419-422. [R]

Grunstein, M. 1992. Histones as regulators of genes. *Sci. Am.* 267(4): 68-74B. [R]

Heck, M. M. S. 1997. Condensins, cohesins, and chromosome architecture: How to make and break a mitotic chromosome. *Cell* 91: 5-8. [R]

Henikoff, S., K. Ahmad and H. S. Malik. 2001. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098-1102. [R]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871. [P]

Koshland, D. and A. Strunnikov. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 12: 305-333. [R]

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 81 resolution. *Nature* 389: 251-260. [P]

Murphy, T. D. and G. H. Karpen. 1998. Centromeres take flight: Alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell* 93: 317-320. [R]

Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358. [P]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828. [P]

Pluta, A. F., A. M. MacKay, A. M. Ainsztein, A. G. Goldberg and W. C. Earnshaw. 1995. The centromere: Hub of chromosomal activities. *Science* 270: 1591-1594. [R]

Richmond, T. J., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes and A. Klug. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 81 resolution. *Nature* 311: 532-537. [R] Saitoh, Y. and U. K. Laemmli. 1994. Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609-622. [P]

Schueler, M. G., A. W. Higgins, M. Katharine Rudd, K. Gustashaw and H. F. Willard. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294: 109-115. [P]

Sun, X., J. Wahlstrom and G. Karpen. 1997. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91: 1007-1019. [P]

Szostak, J. W. and E. H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815. [P]

Tyler-Smith, C. and G. Floridia. 2000. Many paths to the top of the mountain: diverse evolutionary solutions to centromere structure. *Cell* 102: 5-8. [R] Van Holde, K. E. and J. Zlatanovai. 1995. Chromatin higher order structure: Chasing a mirage. *J. Biol. Chem.* 270: 8373-8376. [R]

Wiens, G. R. and P. K. Sorger. 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93: 313-316. [R]

Zakian, V. A. 1995 Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270: 1601-1607. [R]

### *Secuencias de los genomas completos*

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melano gaster*. *Science* 287: 2185-2195. [P]

Baltimore, D. 2001. Our genome unveiled. *Nature* 409: 814-816. [R]

Bennetzen, J. 2002. Opening the door to comparative plant biology. *Science* 296: 60-63. [R]

Blattner, F.R., G. Plunkett III., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462. [P]

Bult, C. J. and 39 others. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073. [P]

Chakravarti, A. 2001. Single nucleotide polymorphisms: to a future of genetic medicine. *Nature* 409: 822-823. [R]

Chervitz, S. A., L. Aravind, G. Sherlock, C. A. Ball, E. V. Koonin, S. S. Dwight, M. A. Harris, K. Dolinski, S. Mohr, T. Smith, S. Weng, J. M. Cherry and D. Botstein. 1998. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: Orthology and divergence. *Science* 282: 2022-2028. [R]

Fleischmann, R. D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512. [P]

Fraser, C. M. and 28 others. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403. [P]

Garza, D., J. W. Ajioka, D. T. Burke and D. L. Hartl. 1989. Mapping the *Drosophila* genome with yeast artificial chromosomes. *Science* 246: 641-646. [R]

Goff, S. A. and 54 others. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296: 92-100. [P]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Martienssen, R. and W. R. McCombie. 2001. The first plant genome. *Cell* 105: 571-574. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562. [P] Oliver, S. G. and 146 others. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38-46. [P]

Peltonen, L. and V. A. McKusick. 2001. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 291: 1224-1229. [R]

Rubin, G. M. 2001. The draft sequences: comparing species. *Nature* 409: 820-821. [R]

Rubin, G. M. and 54 others. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287: 2204-2215. [R]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815. [P]

# 5

# Replicación, mantenimiento y reorganización del ADN genómico



EL PROCESO BIOLÓGICO FUNDAMENTAL DE LA REPRODUCCIÓN requiere la transmisión fiel de la información genética de padres a hijos. Por tanto, resulta esencial la replicación exacta del ADN genómico para la vida de todas las células y organismos. Cada vez que una célula se divide, su genoma completo debe duplicarse, necesitándose una compleja maquinaria para copiar las grandes moléculas de ADN que componen los cromosomas procariotas y eucariotas. Además, las células han desarrollado mecanismos para corregir los fallos que algunas veces se cometen durante la replicación del ADN y para reparar los daños que puedan surgir por la acción de agentes ambientales, como la radiación. Las anormalidades de estos procesos dan como resultado una replicación y un mantenimiento fallido del ADN genómico —un fallo que puede causar consecuencias desastrosas, como el desarrollo de un cáncer—.

A pesar de la importancia de la replicación exacta y el mantenimiento del ADN, los genomas celulares no son estáticos. Para que las especies evolucionen, son necesarias mutaciones y reorganizaciones para mantener la variación genética entre los individuos. La recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis desempeña un importante papel en este proceso puesto que permite a los genes parentales reorganizarse en nuevas combinaciones en la siguiente generación. Las reorganizaciones de las secuencias de ADN dentro del genoma se cree que también contribuyen a la evolución mediante la creación de nuevas combinaciones de información genética. Además, algunas reorganizaciones del ADN están programados para regular la expresión génica durante la diferenciación y el desarrollo de células individuales y organismos. En humanos, un ejemplo destacado es la reorganización de los genes de anticuerpos durante el desarrollo del sistema inmunológico. Un cuidadoso equilibrio entre el mantenimiento y la variación de la información genética resulta por tanto crítico tanto para el desarrollo de los organismos individuales como para la evolución de las especies.

## Replicación del ADN

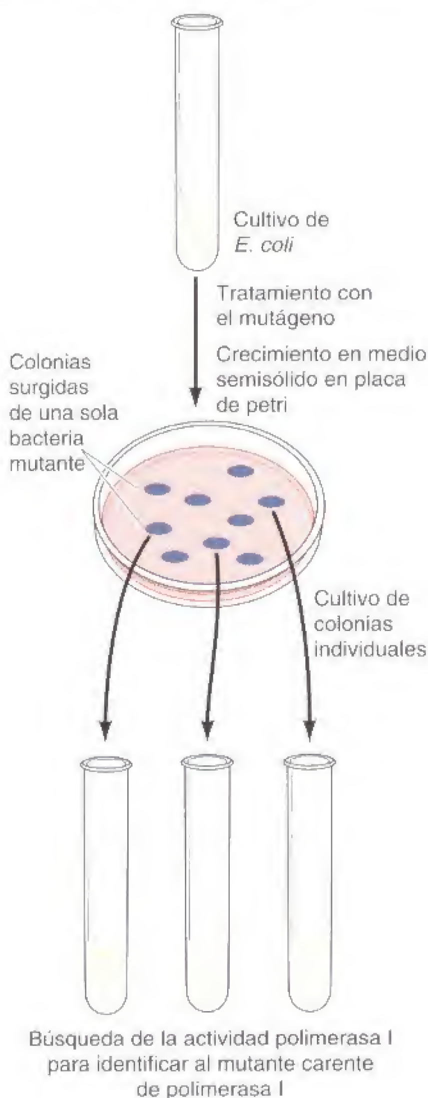
Tal y como explicamos en el Capítulo 3, la replicación del ADN es un proceso semiconservativo en el que cada hebra parental sirve como molde para la síntesis de una nueva hebra hija complementaria. La enzima principal implicada es la ADN polimerasa, que cataliza la unión de los desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (dNTPs) para formar la cadena de ADN en crecimiento. Sin embargo, la replicación del ADN es mucho más compleja que una reacción enzimática. Están involucradas otras proteínas, y son necesarios mecanismos de lectura para

asegurar que la exactitud de la replicación es compatible con la baja frecuencia de errores que se permiten en la reproducción celular. También son necesarias proteínas adicionales y secuencias de ADN para iniciar la replicación y para copiar los extremos de los cromosomas eucariotas.

## *ADN polimerasas*

La **ADN polimerasa** se identificó por primera vez en lisados de *E. coli* por Arthur Kornberg en 1956. La capacidad de esta enzima para copiar exactamente una hebra molde de ADN proporciona una base bioquímica para el modelo de replicación del ADN que inicialmente propusieron Watson y Crick, por lo que su aislamiento representó un descubrimiento importante en la biología molecular. Irónicamente, sin embargo, esta primera ADN polimerasa identificada (ahora llamado ADN polimerasa I) no es la enzima principal responsable de la replicación en *E. coli*. En su lugar, ahora está claro que tanto las células procariotas como eucariotas contienen diferentes ADN polimerasas con funciones distintas en la replicación y reparación del ADN.

*Figura 5.1*
**Aislamiento de un mutante deficiente en la polimerasa I.** Un cultivo de *E. coli* fue tratado con un mutágeno químico, y se aislaron colonias individuales de bacterias mediante su crecimiento en un medio semisólido. Se cultivaron y revisaron varios cientos de colonias para identificar a un mutante carente de polimerasa I.




La multiplicidad de las ADN polimerasas se halló por primera vez mediante el aislamiento de una cepa mutante de *E. coli* que era deficiente en la polimerasa I (Fig. 5.1). Los cultivos de *E. coli* se trataron con un agente químico (un **mutágeno**) que induce una frecuencia alta de mutaciones, se aislaron colonias bacterianas individuales y se analizaron para una cepa mutante carente de la polimerasa I. El análisis de unos pocos miles de colonias condujo al aislamiento del mutante deseado, que era casi completamente defectuoso en la actividad de la polimerasa I. De forma sorprendente, la bacteria mutante creció con normalidad, llegando a la conclusión de que la polimerasa I no es necesaria para la replicación del ADN. Por el contrario, la bacteria mutante era extremadamente sensible a los agentes que dañan al ADN (p. ej., la luz ultravioleta), sugiriendo que la polimerasa I está implicada principalmente en la reparación del ADN dañado en lugar de en la replicación del ADN *per se*.

La conclusión de que la polimerasa I no es necesaria para la replicación implicaba que *E. coli* debería contener otras ADN polimerasas, por lo que subsecuentes experimentos condujeron a la identificación de otras dos enzimas, llamadas ahora ADN polimerasa II y III. Los papeles potenciales de estas enzimas se investigaron mediante el aislamiento de mutantes apropiados. En las cepas de *E. coli* con mutaciones en la polimerasa II se observó que crecían y se comportaban con normalidad, por lo que el papel de esta enzima en la célula es desconocido. Los mutantes polimerasa III sensibles a la temperatura, sin embargo, fueron incapaces de replicar su ADN a altas temperaturas, y estudios subsecuentes han confirmado que la polimerasa III es la enzima replicativa principal en *E. coli*.

Se sabe que, además de la polimerasa III, la polimerasa I también es necesaria para la replicación del ADN de *E. coli*. El mutante original de la polimerasa I no era completamente defectivo para esta enzima, y experimentos posteriores mostraron que la actividad de la polimerasa I residual en estas cepas desempeña un papel clave en el proceso de la replicación. La replicación del ADN de *E. coli* implica por tanto dos ADN polimerasas diferentes, cuyas funciones principales se discuten a continuación.

Las células eucariotas contienen cinco ADN polimerasas: $\alpha$, $\beta$, $\gamma$, $\delta$, y $\varepsilon$. La polimerasa $\gamma$ se localiza en la mitocondria y es responsable de la replicación del ADN mitocondrial. Las otras cuatro enzimas se encuentran localizadas en el núcleo y son por tanto candidatas para la replicación del ADN nuclear. Las polimerasas $\alpha$, $\delta$, y $\varepsilon$ están más activas en las células en división, sugiriendo que funcionan en la replicación. Por otro lado, la polimerasa $\beta$ está activa en las células en división y en no-división, sugiriendo que puede funcionar principalmente en la reparación del ADN dañado.

Dos tipos de experimentos han proporcionado posterior evidencia de los papeles de las polimerasas $\alpha$, $\delta$, y $\varepsilon$ en la replicación del ADN. Primero, la replica-

ción de los ADN de algunos virus animales, como el SV40, se pueden estudiar en extractos libres de células. La posibilidad de estudiar la replicación *in vitro* ha permitido la identificación directa de las enzimas involucradas, y el análisis de tales sistemas libres de células ha mostrado que la polimerasas $\alpha$ y $\delta$, son necesarias para la replicación del ADN del SV40. Segundo, las polimerasas $\alpha$, $\delta$ y $\varepsilon$ se encuentran en levaduras y en células de mamíferos, permitiendo el uso de las poderosas aproximaciones de la genética de levaduras (véase Cap. 3) para testar sus funciones biológicas directamente. Tales estudios indican que las levaduras mutantes carentes de alguna de estas tres ADN polimerasas son incapaces de proliferar, implicando el papel crítico de la polimerasa $\varepsilon$ al igual que el de $\alpha$ y $\delta$. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la función esencial de la polimerasa $\varepsilon$ en levaduras no necesita su actividad como ADN polimerasa replicativa. El papel de la polimerasa $\varepsilon$ en la replicación del ADN continúa sin aclarar, aunque probablemente funcione de forma similar a la polimerasa $\delta$, que es suficiente para catalizar la replicación del ADN en ausencia de polimerasa $\varepsilon$ tanto en sistemas acelulares como en levaduras.

Todas las ADN polimerasas conocidas comparten dos propiedades fundamentales que traen complicaciones críticas para la replicación del ADN (Fig. 5.2). Primero, todas las polimerasas sintetizan ADN solo en dirección 5'-3', añadiendo a la cadena en crecimiento un dNTP al grupo 3' hidroxilo. Segundo, las ADN polimerasas pueden añadir un nuevo deoxirribonucleótido solamente a una hebra con un cebador o iniciador preformado que está unido por puentes de hidrógeno a la hebra molde; no son capaces de iniciar la síntesis del ADN *de novo* catalizando la polimerización de los dNTP libres. Respecto a ello, las ADN polimerasas difieren de las ARN polimerasas, que pueden iniciar la síntesis de una nueva hebra de ARN en ausencia de un cebador. Tal y como discutiremos

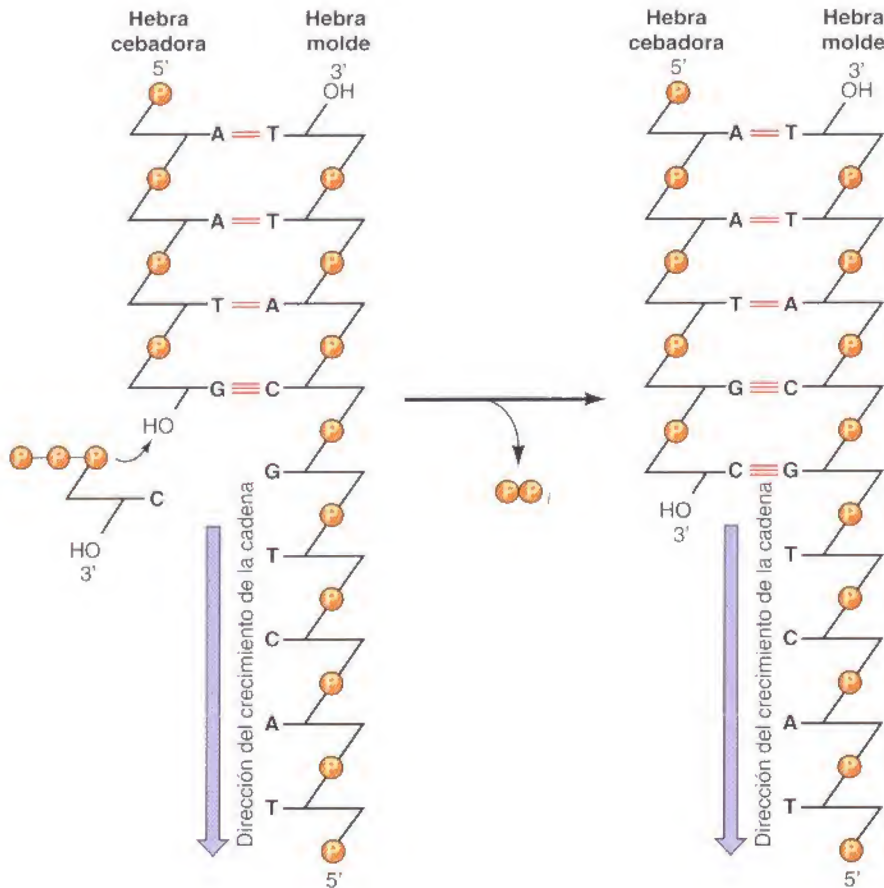



*Figura 5.2*
**Reacción catalizada por la ADN polimerasa.** Todas las ADN polimerasas conocidas añaden un desoxirribonucleósido 5'-trifosfato al grupo 3' hidroxilo de una cadena de ADN creciente (la hebra cebadora).

más tarde en este capítulo, estas propiedades de las ADN polimerasas parecen ser críticas para el mantenimiento de la alta fidelidad de la replicación del ADN necesaria para la reproducción celular.

## *Horquilla de replicación*

Las moléculas de ADN en proceso de replicación se analizaron por primera vez por John Cairns en experimentos en los que *E. coli* se cultivó en presencia de timidina radiactiva, lo que permitió la visualización por autorradiografía del nuevo ADN replicado (Fig. 5.3). En algunos casos, se pueden observar moléculas circulares completas en proceso de replicación. Estas moléculas de ADN contienen dos **horquillas de replicación**, que representan las regiones de la síntesis activa de ADN. En cada horquilla las hebras parentales se separan y son sintetizadas dos nuevas hebras hijas.

La síntesis de dos nuevas hebras de ADN complementarias a las dos hebras de la molécula parental trajo consigo un problema importante para entender la bioquímica de la replicación del ADN. Puesto que las dos hebras de la doble hélice de ADN se disponen en direcciones opuestas (antiparalelas), la síntesis continua de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación requeriría que una de las hebras se sintetizara en sentido 5′ a 3′ mientras que la otra se sintetizaría en el sentido opuesto (3′ a 5′). Pero la ADN polimerasa cataliza la polimerización de los dNTPs solamente en sentido 5′ a 3′. Entonces, ¿cómo puede ser sintetizada la otra hebra de ADN?

El enigma se resolvió mediante experimentos que mostraban que solo una hebra de ADN se sintetiza de manera continua en la dirección de la replicación del ADN; la otra se forma a partir de pequeñas piezas discontinuas de ADN que se sintetizan al revés con respecto al movimiento de la horquilla de replicación (Fig. 5.4). Estas pequeñas piezas del nuevo ADN sintetizado (llamados **fragmentos de Okazaki** después de su descubrimiento) se unen por la acción de la **ADN ligasa**, formando una nueva hebra intacta de ADN. La hebra sintetizada de forma continua se denomina **hebra conductora**, debido a que su elongación en el sentido del movimiento de la horquilla de replicación expone el molde que se utilizará para la síntesis de los fragmentos de Okazaki (**hebra tardía**).

Aunque el descubrimiento de la síntesis discontinua de la hebra rezagada proporciona un mecanismo para la elongación de ambas hebras de ADN en la horquilla de replicación, surgió otra pregunta: puesto que las ADN polimerasas necesitan un cebador y no son capaces de iniciar la síntesis *de novo*,

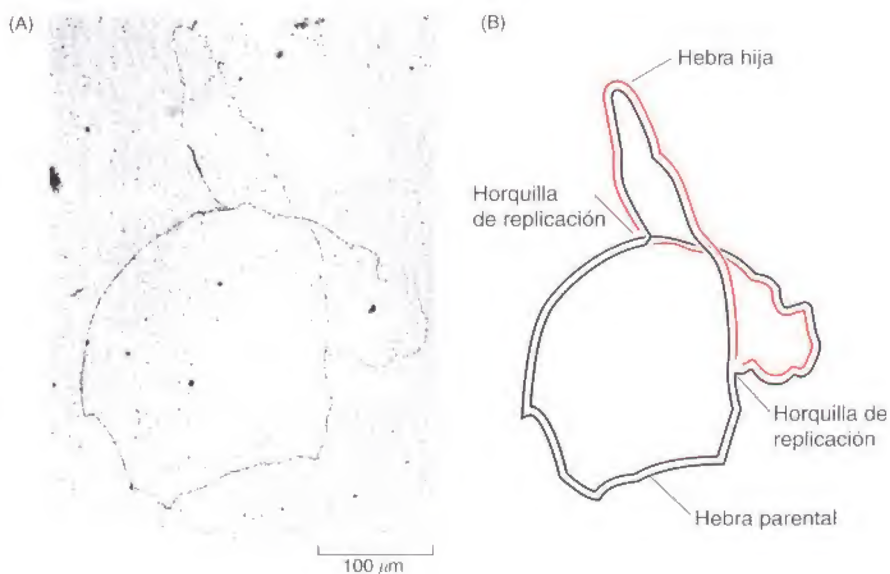



*Figura 5.3*
**Replicación del ADN de *E. coli*.** (A) Una autorradiografía mostrando las bacterias que crecieron en [$^3$H]timidina durante dos generaciones para marcar el ADN, que se extrajo después para visualizarlo mediante una cinta fotográfica. (B) Este esquema ilustra las dos horquillas de replicación vistas en (A). (De J. Cairns, 1963. *Cold Spring Harbord Symp. Quant. Biol.* 28:43.)

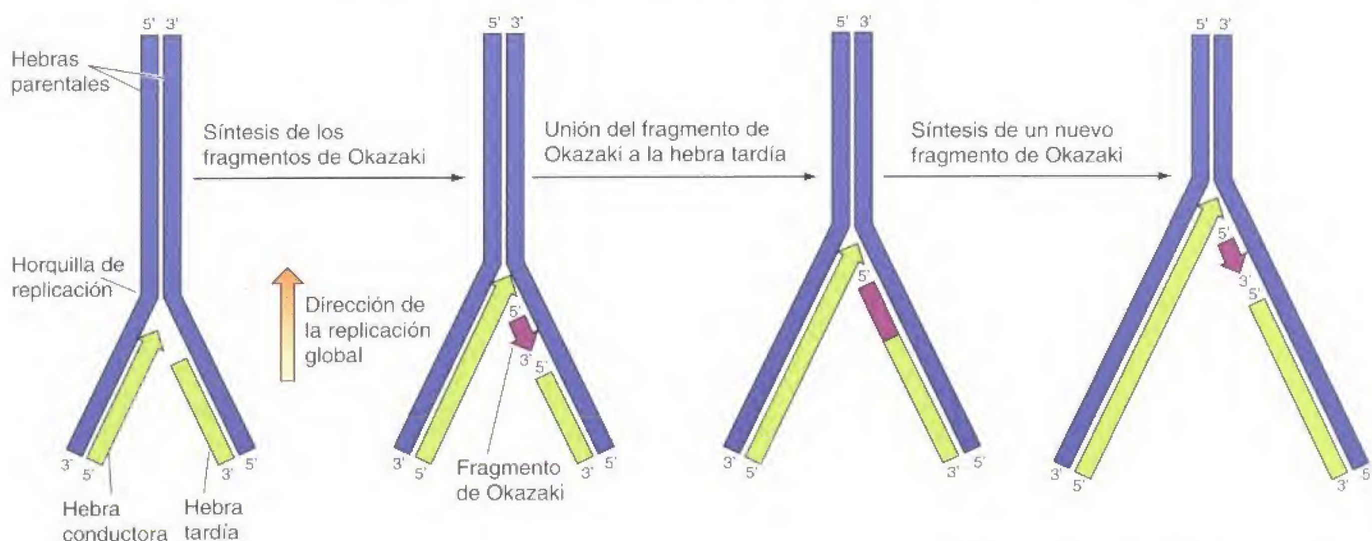
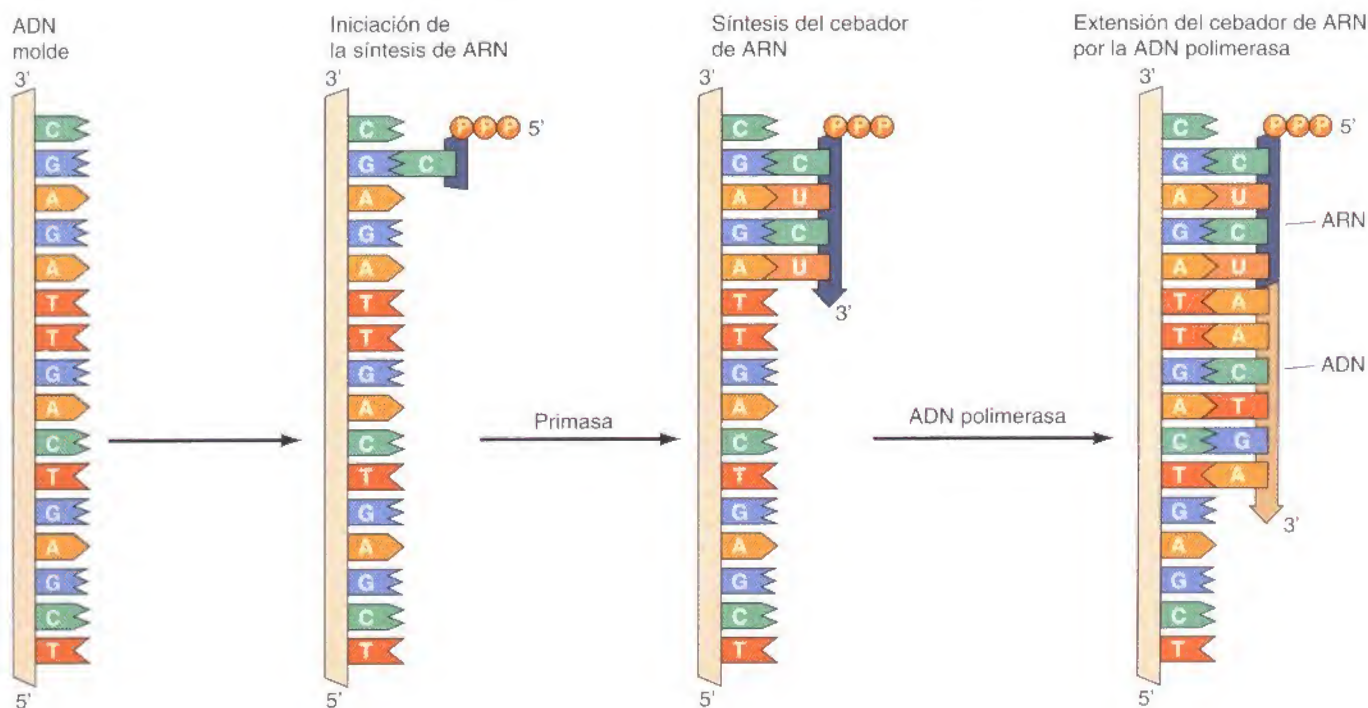



*Figura 5.4*
**Síntesis de las hebras conductora y tardía de ADN.** La hebra conductora se sintetiza de forma continua en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación. La hebra tardía se sintetiza en pequeños fragmentos (fragmentos de Okazaki) en sentido opuesto al resto de la replicación. Los fragmentos de Okazaki se unen después mediante la acción de la ADN ligasa.

¿cómo se inicia la síntesis de los fragmentos de Okazaki? La respuesta son los fragmentos cortos de ARN que sirven como iniciadores para la replicación del ADN (Fig. 5.5). Al contrario que la síntesis de ADN, la síntesis de ARN es capaz de iniciarse *de novo,* y una enzima llamada **primasa** sintetiza los fragmentos cortos de ARN (p. ej., de tres a diez nucleótidos de longitud) complementarios a la hebra rezagada molde en la horquilla de replicación. Los fragmentos de Okazaki se sintetizan mediante la extensión de estos iniciadores de ARN por la ADN polimerasa. Una consecuencia importante de estos iniciadores de ARN es que los nuevos fragmentos de Okazaki sintetizados contienen una unión ARN-ADN, cuyo descubrimiento proporcionó la evidencia del papel de los iniciadores de ARN en la replicación del ADN.

Para formar una hebra tardía continua de ADN, los iniciadores de ARN deben eliminarse de los fragmentos de Okazaki y ser reemplazados por ADN. En *E. coli,* los iniciadores de ARN se eliminan por la acción combinada de la **ARNasa H**, una

*Figura 5.5*
**Origen de los fragmentos de Okazaki con cebadores de ARN.** Fragmentos cortos de ARN sirven como iniciadores sobre los que puede actuar la ADN polimerasa.



enzima que degrada la hebra de ARN de los híbridos ARN-ADN, y la polimerasa I. En la replicación del ADN de *E. coli* este es el aspecto en el que la polimerasa I desempeña un papel primordial. Además de su actividad como ADN polimerasa, la polimerasa I actúa como una **exonucleasa** que puede hidrolizar al ADN (o ARN) en sentido 5′ a 3′ o 3′ a 5′. La acción de la polimerasa I como una exonucleasa de 5′ a 3′ elimina ribonucleótidos de los extremos 5′ de los fragmentos de Okazaki, permitiendo ser reemplazados por desoxirribonucleótidos para producir fragmentos constituidos enteramente de ADN (Fig. 5.6). En las células eucariotas, otras exonucleasas toman el puesto de la polimerasa I de *E. coli* en la eliminación de los iniciadores, rellenándose los huecos entre los fragmentos de Okazaki con la acción de la polimerasa $\delta$. Como en procariotas, estos fragmentos de ADN son unidos por la ADN ligasa.

Las diferentes ADN polimerasas desempeñan por tanto papeles distintos en la horquilla de replicación (Fig. 5.7). En las células procariotas, la polimerasa III es la principal polimerasa de replicación, actuando en la síntesis de la hebra conductora de ADN y de los fragmentos de Okazaki a partir de los cebadores de ARN. La polimerasa I elimina los iniciadores de ARN y rellena los espacios entre los fragmentos de Okazaki. En células eucarióticas, la polimerasa $\alpha$ se encuentra formando un complejo con la primasa, y parece funcionar en conjunción con la primasa para sintetizar pequeños fragmentos de ARN-ADN durante la síntesis de la hebra tardía. La polimerasa $\delta$ entonces puede sintetizar tanto la hebra conductora como la tardía, actuando para extender los cebadores de ARN-ADN inicialmente sintetizados por el complejo polimerasa $\alpha$-primasa. Además, la polimerasa $\delta$ puede ocupar el lugar de la polimerasa I de *E. coli* rellenando los espacios entre fragmentos de Okazaki después de la eliminación del cebador. Aunque el papel de la polimerasa $\varepsilon$ todavía no se comprende por completo, sus actividades parecen ser similares a las de la polimerasa $\delta$.

No sólo las polimerasas y las primasas actúan en la horquilla de replicación sino que participan otras muchas proteínas. Estas proteínas adicionales se han identificado mediante el análisis de mutantes de *E. coli* defectuosos en la repli-

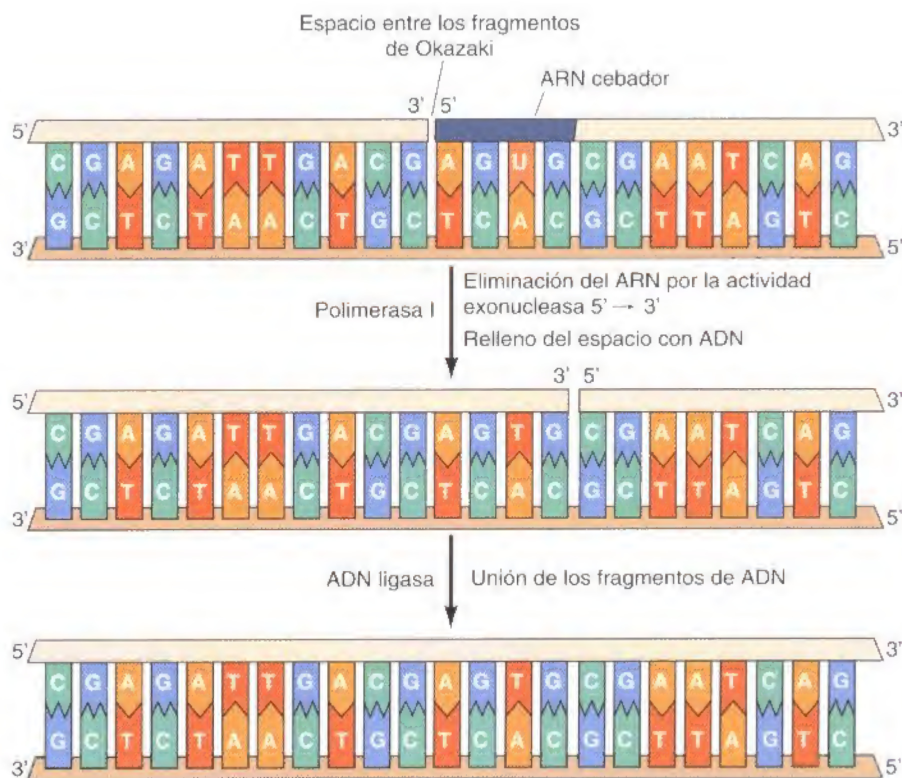



*Figura 5.6*
**Eliminación de los cebadores de ARN y unión de los fragmentos de Okazaki.** Debido a su actividad exonucleasa de 5′ a 3′, la ADN polimerasa I elimina los iniciadores de ARN y rellena los espacios entre los fragmentos de Okazaki con ADN. Los fragmentos de ADN resultantes son unidos con posterioridad por la ADN ligasa.

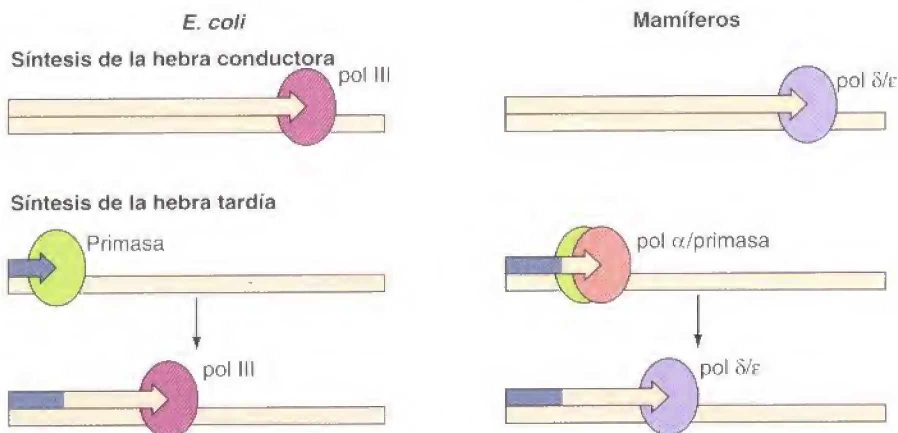
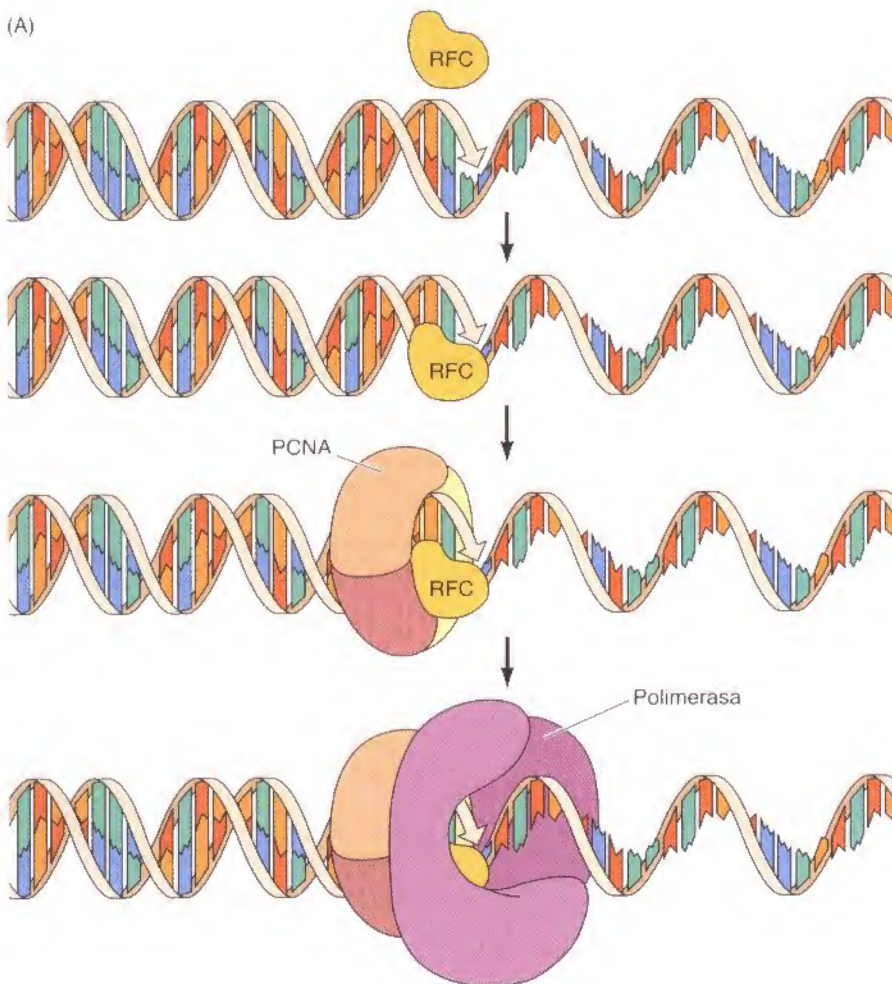



*Figura 5.7*
**Papel de las ADN polimerasas en *E. coli.* y en células de mamíferos.** La hebra conductora es sintetizada por las polimerasa III (pol III) en *E. coli* y por la polimerasas δ y ε (pol δ/ε) en las células de los mamíferos. En *E. coli*, una primasa inicia la síntesis de la hebra tardía, siendo leídos los iniciadores de ARN por la polimerasa III. En las células de los mamíferos, la síntesis de la hebra tardía la lleva a cabo un complejo de primasa y polimerasa α (pol α). Los fragmentos cortos de ARN-ADN sintetizados por el complejo son leídos por las polimerasas δ y ε.

cación del ADN y la purificación de proteínas de mamíferos necesarias para la replicación *in vitro* del ADN de SV40. Una clase de proteínas necesarias para la replicación se unen con las ADN polimerasas, aumentando la actividad de las polimerasas y manteniéndolas unidas al molde de ADN para que continúen la síntesis de la nueva hebra de ADN. Tanto la polimerasa III de *E. coli* como la polimerasa δ y ε de eucariotas están asociadas a dos tipos de proteínas ac-



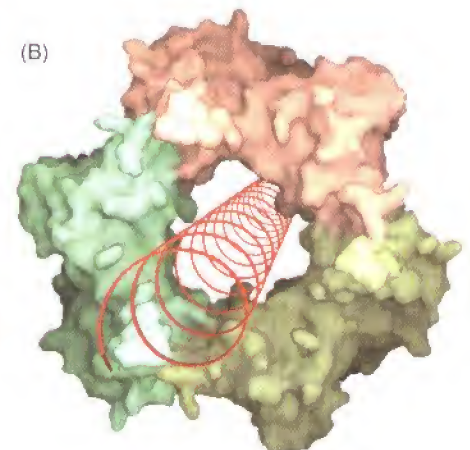




*Figura 5.8*
**Proteínas accesorias a la polimerasa.** (A) La proteína de enganche de carga (RFC en las células de mamíferos) se acopla al ADN en la unión entre el cebador y el molde. La proteína de enganche deslizante (PCNA en las células de mamíferos) se une adyacente a la RFC, uniéndose la ADN polimerasa a la PCNA. (B) Modelo de unión de la PCNA al ADN. (B, de T. S. Krishna, X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers y J. Kuriyan, 1994. *Cell* 79: 1233.)

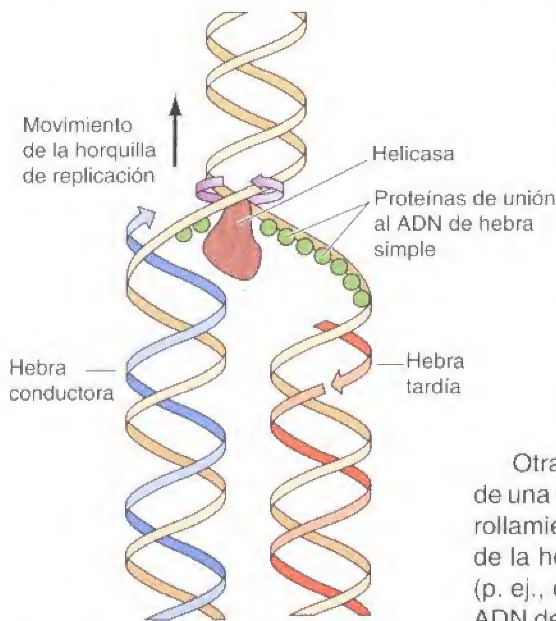



*Figura 5.9*
**Acción de la helicasa y las proteínas de unión al ADN de hebra simple.** Las helicasas desenrollan las dos hebras del ADN parentales situado en la cabeza de la horquilla de replicación. Las hebras de ADN desenrolladas son estabilizadas por las proteínas de unión al ADN de hebra simple de manera que puedan servir como moldes para la síntesis de un nuevo ADN.

cesorias (proteínas de enganche deslizantes y proteínas de enganche de carga) que sitúan a la polimerasa en el cebador y mantienen su asociación estable con el molde (Fig. 5.8). Las proteínas de enganche de carga (llamadas el complejo $\gamma$ en *E. coli* y factor de replicación C en eucariotas [RFC]) específicamente reconocen y se unen al ADN de la zona de unión entre el cebador y el molde. Las proteínas de enganche deslizantes(proteína $\beta$ en *E. coli* y antígeno nuclear de proliferación celular [PCNA] en eucariotas) se une adyacente a las proteínas de enganche de carga, formando un anillo alrededor del ADN molde. Las proteínas de enganche descargan después la ADN polimerasa en el ADN en la unión entre el cebador y el molde. El anillo formado por las de enganche deslizante mantiene la asociación de la polimerasa con su molde durante la replicación, permitiendo la síntesis ininterrumpida de miles de nucleótidos de ADN.

Otras proteínas desenrollan la hebra molde de ADN y estabilizan regiones de una sola hebra (Fig. 5.9). Las **helicasas** son enzimas que catalizan el desenrollamiento del ADN parental, emparejadas con la hidrólisis de ATP, a la cabeza de la horquilla de la replicación. **Proteínas de unión al ADN monocatenario** (p. ej., el factor de replicación A eucariota [RFA]) estabilizan la hebra molde de ADN desenrollada, manteniéndola en un estado de hebra única extendida para que sea copiada por la polimerasa.

A medida que las hebras parentales se desenrollan, el ADN a la cabeza de la horquilla de replicación está siendo forzado a girar. Sin restricciones, esta rotación causaría que las moléculas de ADN circular (como el ADN de SV40 o el cromosoma de *E. coli*) se enrollaran sobre sí mismas, bloqueando eventualmente la replicación (Fig. 5.10). Este problema lo resuelven las **topoisomerasas**, enzimas que catalizan la rotura reversible y la unión de las hebras de ADN. Existen dos tipos de estas enzimas: Topoisomerasas de tipo I que rompen solo una hebra de ADN; topoisomerasas de tipo II que introducen roturas simultáneas en ambas hebras. Las roturas introducidas por los tipos I y II de las topoisomerasas sirven como ejes de giro que permiten a las dos hebras molde de ADN rotar o pivotar libremente alrededor de la otra de manera que la replicación puede continuar sin el enrollamiento del ADN a la cabeza de la horquilla (véase Fig. 5.10). Aunque los cromosomas eucariotas están compuestos por moléculas de ADN lineares en lugar de circulares, su replicación también requiere to-

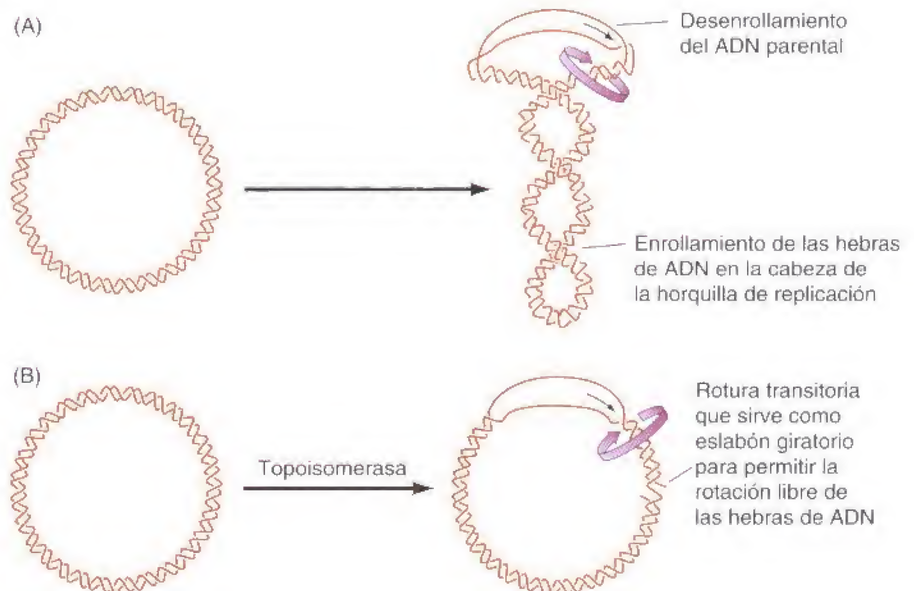



*Figura 5.10*
**Acción de las topoisomerasas durante la replicación del ADN.** (A) Una vez que las dos hebras de ADN están desenrolladas, el ADN que se encuentra en la cabeza de la horquilla de replicación es forzado a rotar en dirección opuesta, de forma que las moléculas circulares se enrollan sobre sí mismas. (B) Este problema lo resuelven las topoisomerasas, que catalizan la rotura y la unión reversibles de las hebras de ADN. Las roturas transitorias introducidas por estas enzimas actúan como eslabones giratorios que permiten a las dos hebras de ADN rotar libremente una sobre otra.

poisomerasas; si no los cromosomas completos tendrían que rotar continuamente durante la síntesis de ADN.

La topoisomerasa de tipo II es necesaria no solo para desenrollar el ADN sino también para separar las nuevas moléculas replicadas de ADN circular que aparecen entrelazadas las unas con las otras. En las células eucariotas, la topoisomerasa II parece estar involucrada en la condensación mitótica de los cromosomas. Además, estudios realizados en levaduras mutantes, así como experimentos en *Drosophila* y células de mamíferos, indican que la topoisomerasa II es necesaria para la separación de las cromátidas hijas durante la mitosis, sugiriendo que desempeña una función de desenrollamiento de los lazos de nueva replicación del ADN en los cromosomas de eucariotas.

Las enzimas implicadas en la replicación del ADN actúan de forma coordinada para sintetizar las hebras conductora y tardía de ADN simultáneamente en la horquilla de replicación (Fig. 5.11). Esta característica esta acompañada por la formación de dímeros de las polimerasas ADN replicativas (polimerasa III en *E. coli* o polimerasa $\delta/\varepsilon$ en eucariotas), cada una de ellas con sus proteinas accesorias adecuadas. Una molécula de polimerasa actúa entonces en la síntesis de la hebra conductora mientras que otra molécula actúa en la síntesis de la hebra tardía. La hebra tardía molde se cree que forma un lazo en la horquilla de replicación de manera que la subunidad de la polimerasa que participa en la síntesis de la hebra tardía se mueve en la misma dirección que la otra subunidad, que está sintetizando la hebra conductora.

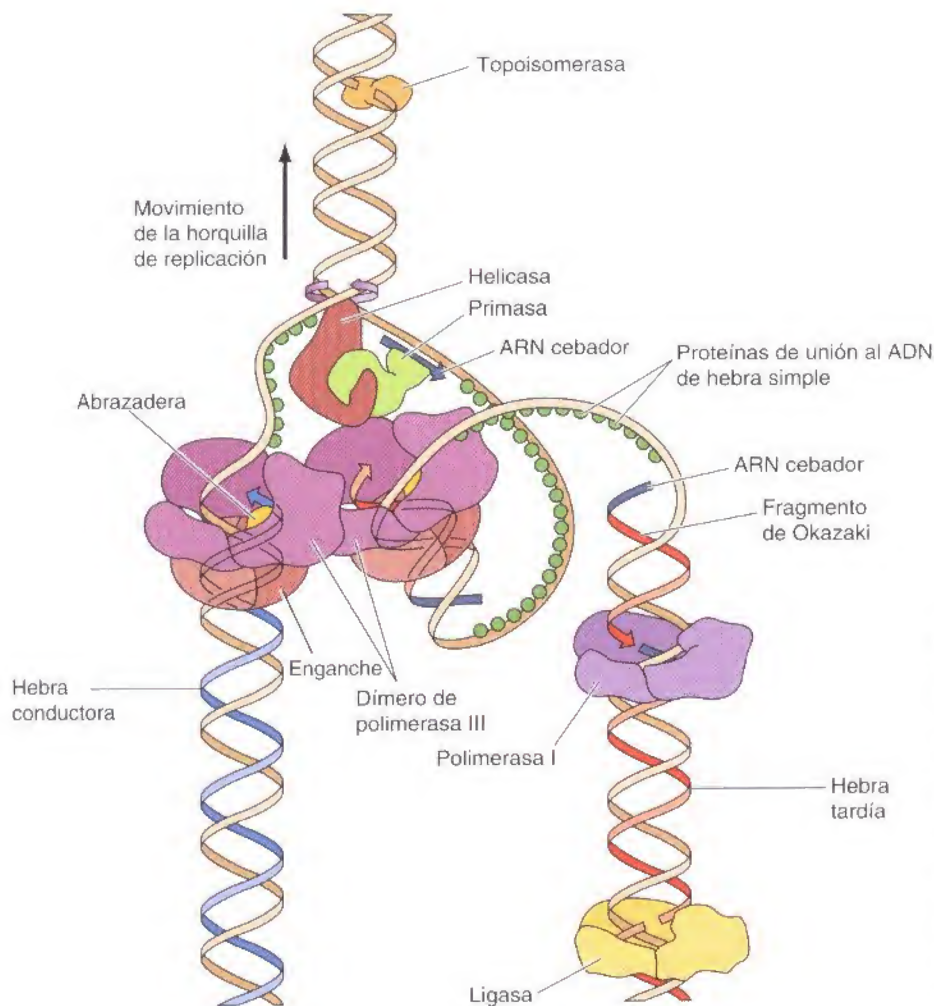



*Figura 5.11*
**Modelo de la horquilla de replicación de *E. coli*.** Una helicasa, una primasa, y dos moléculas de ADN polimerasa III llevan a cabo la síntesis coordinada de las hebras conductora y tardía del ADN. El molde de la hebra tardía se pliega para que la polimerasa responsable de la síntesis de la hebra tardía se mueva en la misma dirección que el movimiento de la horquilla. La topoisomerasa actúa como un eslabón giratorio en la cabeza de la horquilla, y la polimerasa I junto con una ligasa eliminan los cebadores de ARN y unen los fragmentos de Okazaki por detrás de la horquilla.

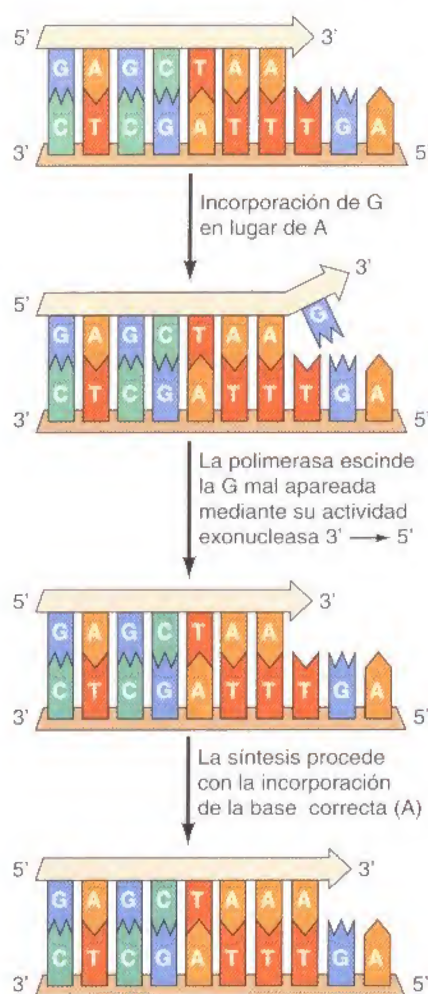



*Figura 5.12*
**Doble lectura de la ADN polimerasa.** Se incorpora G en lugar de A como resultado de un mal apareamiento con T en la hebra molde. Debido a este mal apareamiento, la G del extremo 3' terminal no se une mediante enlaces de hidrógeno a la hebra molde. Este error de emparejamiento en el extremo 3' de la cadena en crecimiento es reconocido y eliminado por la actividad exonucleasa 3'-5' de la ADN polimerasa, quien necesita para continuar la síntesis un cebador unido por puentes de hidrógeno a la hebra molde. Tras la escisión de la G desapareada, la síntesis de ADN continua con la incorporación del nucleótido correcto (A).

### *Fidelidad de replicación*

La exactitud de la replicación del ADN es crítica para la reproducción celular, y las estimaciones de mutación para una variedad de genes indican que la frecuencia de errores durante la replicación corresponde tan solo a una base incorrecta por cada $10^9$ a $10^{10}$ nucleótidos incorporados. Esta frecuencia de error es mucho menor que la predicha simplemente a causa del apareamiento de las bases complementarias. En particular, las diferencias de energía libre resultantes de cambios entre los enlaces de hidrógeno establecidos entre bases emparejadas correcta e incorrectamente, sólo son lo suficientemente grandes como para favorecer la formación de pares de bases emparejadas correctamente unas 1.000 veces. Como consecuencia, la selección de las bases determinada simplemente por los enlaces de hidrógeno entre bases complementarias, resultaría en una frecuencia de error correspondiente a la incorporación de aproximadamente una base incorrecta por cada $10^3$. El alto grado de fidelidad realmente alcanzado es el resultado de las actividades de la ADN polimerasa.

Uno de los mecanismos por los que la ADN polimerasa aumenta la fidelidad de la replicación es ayudando a seleccionar la base correcta para la inserción en el nuevo ADN sintetizado. La polimerasa no solo cataliza la incorporación de cualquier nucleótido unido por un puente de hidrógeno a la hebra molde. En su lugar, discrimina activamente en contra de la incorporación de una base desapareada, presumiblemente mediante la adaptación de la conformación de un par de bases correcto. El mecanismo molecular responsable de la capacidad de las ADN polimerasas para seleccionar en contra de bases incorrectas aún no se ha descifrado, pero esta selección parece aumentar la exactitud de la replicación alrededor de cien veces, reduciendo la frecuencia de error esperada de $10^{-4}$ aproximadamente a $10^{-6}$.

El otro mecanismo principal responsable de la exactitud de la replicación del ADN es la actividad de **doble lectura** de la ADN polimerasa. Como ya hemos dicho, la polimerasa I de *E. coli* tiene una actividad exonucleasa 3' a 5'y 5' a 3'. La exonucleasa de 5' a 3' opera en la dirección de la síntesis de ADN y ayuda a eliminar los cebadores de ARN de los fragmentos de Okazaki. La exonucleasa de 3' a 5'opera en dirección opuesta a la síntesis de ADN, y participa en la doble lectura del nuevo ADN sintetizado (Fig. 5.12). La doble lectura es efectiva porque la ADN polimerasa necesita un cebador y no es capaz de iniciar la síntesis *de novo*. Los iniciadores que están unidos por puentes de hidrógeno al molde son los preferidos para su utilización, así que cuando una base incorrecta es incorporada, se eliminará por la actividad de la exonucleasa 3' a 5' en lugar de continuar la síntesis. Tales actividades de las exonucleasas 3' a 5'también se encuentran asociadas a la polimerasa III de *E. coli* y a las polimerasas eucariotas $\delta$ y $\varepsilon$. Las exonucleasas 3' a 5'de estas polimerasas escinden selectivamente las bases desapareadas que han sido incorporadas al final de una cadena de ADN en crecimiento, por lo que aumenta la exactitud de la replicación de cien a mil veces más.

La importancia de la doble lectura podría explicar el hecho de que las ADN polimerasas necesitan cebadores y que catalizan el crecimiento de las hebras de ADN solamente en el sentido 5' a 3'. Cuando el ADN se sintetiza en el sentido 5' a 3', la energía necesaria para la polimerización se deriva de la hidrólisis del grupo 5'-trifosfato de un dNTP libre y es añadido al grupo 3'-hidroxilo de la cadena creciente (véase Fig. 5.2). Si el ADN se tuviera que extender en sentido 3' a 5', la energía de polimerización tendría que derivarse de la hidrólisis del grupo 5'-trifosfato del nucleótido terminal recién incorporado al ADN. Esto eliminaría la posibilidad de la doble lectura, debido a que la eliminación de un nucleótido terminal desapareado también eliminaría al grupo 5'-trifosfato necesario como fuente de energía para la elongación de la cadena. Por tanto, aunque la capacidad de la ADN polimerasa para extender un cebador en sentido 5' a 3'parece hacer a la replicación un proceso complicado, resulta necesario para asegurar la duplicación exacta del material genético.

Combinada con la capacidad de discriminar en contra de la inserción de bases desapareadas, la actividad de doble lectura de las ADN polimerasas es suficiente para reducir la frecuencia de error de replicación a alrededor de una base desapareada por cada $10^9$. Mecanismos adicionales (discutidos en la sección «Reparación del ADN») actúan para eliminar las bases desemparejadas que han sido incorporadas en el nuevo ADN sintetizado, asegurando así aún más la correcta replicación de la información genética.

### *Orígenes e iniciación de la replicación*

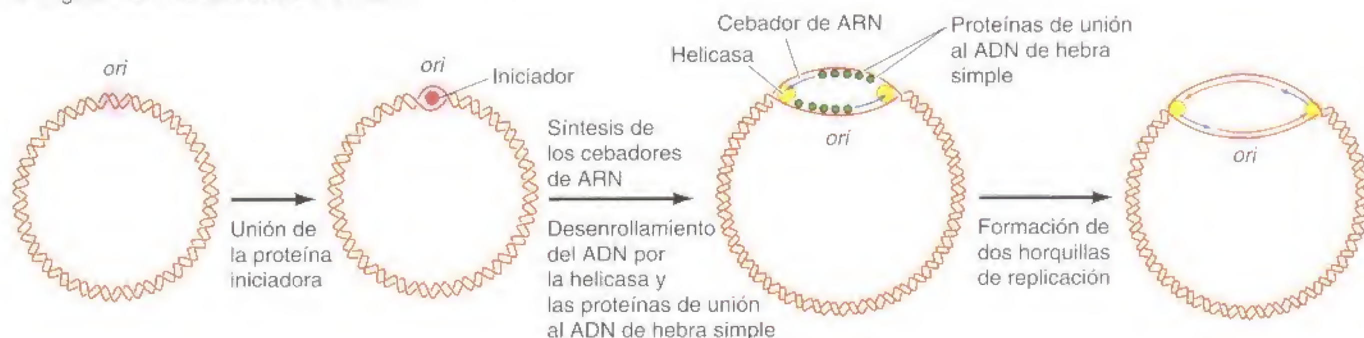
La replicación del ADN procariota y eucariota comienza en una única secuencia llamada **origen de replicación**, que sirve como un sitio específico de unión para proteínas que inician el proceso de replicación. El primer origen descrito fue el de *E. coli*, en cuyo análisis genético mostraba que la replicación siempre empezaba en un único sitio del cromosoma bacteriano. El origen de *E. coli* se ha estudiado en detalle y se sabe que se compone de 245 pares de bases de ADN, elementos que sirven como sitios de unión para las proteínas necesarias para iniciar la replicación del ADN (Fig. 5.13). El paso clave es la unión de una proteína iniciadora a secuencias específicas del ADN dentro del origen. La proteína iniciadora comienza desenrollando el origen del ADN y recluta a las otras proteínas implicadas en la síntesis del ADN. La helicasa junto con proteínas de unión al ADN monocatenario continúan desenrollando y presentando al ADN molde, y la primasa inicia la síntesis de las hebras conductoras. Se forman dos horquillas de replicación que se mueven en sentidos opuestos a lo largo del cromosoma circular de *E. coli*.

El origen de la replicación en los virus de animales, como el SV40, se ha estudiado como modelo para la iniciación de la síntesis en eucariotas. SV40 presenta un solo origen de replicación (consiste en 64 pares de bases) que funciona tanto en células infectadas como en sistemas libres de células. La replicación comienza por una proteína codificada por el virus (llamada antígeno T) que se une al origen y que actúa como helicasa. Se requiere una proteína de unión al ADN monocatenario para estabilizar a la hebra molde desenrollada, y un complejo ADN polimerasa $\alpha$-primasa comienza entonces la síntesis de ADN.

Aunque resulta suficiente un solo origen para dirigir la replicación de genomas bacterianos y virales, se necesitan múltiples orígenes para replicar los genomas más largos de las células eucariotas en un período de tiempo razonable. Por ejemplo, el genoma completo de *E. coli* ($4 \times 10^6$ pares de bases) se replica partiendo de un solo origen en unos 30 minutos. Si los genomas de mamíferos ($3 \times 10^9$ pares de bases) se replicaran a partir de un solo origen esto requeriría

*Figura 5.13*

**Origen de la replicación de *E. coli*.** La replicación se inicia en un único sitio del cromosoma de *E. coli*, denominado origen (*ori*). El primer acontecimiento es la unión de una proteína iniciadora al ADN *ori*, que conduce el desenrollamiento parcial del molde. El ADN continúa desenrollándose debido a la acción de la helicasa y de las proteínas de unión al ADN de hebra simple, mientras que los cebadores son sintetizados por la primasa. Las dos horquillas de replicación formadas en el origen se mueven en direcciones opuestas a lo largo de la molécula de ADN circular.



alrededor de 3 semanas (30.000 minutos). El problema se exacerba por el hecho de que el ritmo de la replicación del ADN en las células de mamíferos es diez veces menor que en *E. coli*, posiblemente como resultado del empaquetamiento del ADN eucariota en cromatina. No obstante, el genoma de las células de mamíferos se replica en pocas horas, necesitando el uso de miles de orígenes de replicación.

La presencia de múltiples orígenes de replicación en las células eucariotas se demostró por primera vez mediante la exposición de un cultivo de células de mamíferos a timidina radiactiva durante intervalos de tiempo diferentes, seguido de una autorradiografía para detectar el ADN recién sintetizado. Los resultados de estos estudios indicaron que la síntesis de ADN se inicia en múltiples sitios, desde donde se prosigue en ambas direcciones a lo largo del cromosoma (Fig. 5.14). Los orígenes de replicación de las células de mamíferos se encuentran separados por intervalos de 50 a 300 kb aproximadamente; por lo que el genoma humano tiene alrededor de 30.000 orígenes de replicación. Los genomas de eucariotas simples también tienen múltiples orígenes; por ejemplo, la replicación en levaduras se inicia en orígenes separados por unas 40 kb.

Los orígenes de replicación de los cromosomas eucariotas han sido estudiados en levaduras, en las que se han identificado como secuencias que pueden soportar la replicación de plásmidos en células transformadas (Fig. 5.15). Esto ha proporcionado un ensayo funcional para estas secuencias, y el aislamiento de otros muchos elementos (llamados **secuencias de replicación autónoma**, o **ARSs**, por las siglas del inglés *autonomously replicating sequences*). El papel de los orígenes de replicación se ha verificado por un análisis bioquímico directo, no solo en plásmidos sino también en el ADN cromosómico de levaduras.

Los elementos funcionales ARS se expanden alrededor de 100 pares de bases, incluyendo una secuencia central de 11 pares de bases común a muchos ARS diferentes (Fig. 5.16). Esta secuencia central es esencial para la función de los elementos ARS y se sabe que es el sitio de unión para un complejo (llamado **complejo del origen de replicación**, o **ORC**, *origin replication complex*) que es necesario para la iniciación de la replicación del ADN en los orígenes de las levaduras. El complejo ORC parece reclutar a otras proteínas (incluidas ADN helicasas) en el origen, lo que conduce a iniciar la replicación. El mecanismo de iniciación de la replicación del ADN en levaduras parece por tanto similar al de los virus procariotas y eucariotas; es decir, una proteína de iniciación se une específicamente a las secuencias de origen.

Estudios subsiguientes han demostrado que el papel de las proteínas ORC como iniciadores de la replicación está conservado en todos los eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Sin embargo, los orígenes de replicación de otros eucariotas están mucho peor definidos que los elementos ARS de *S. cerevisiae*. En la levadura de fisión *S. pombe*, las secuencias de origen se encuentran dispersas sobre aproximadamente 1 kb de ADN. Los orígenes de

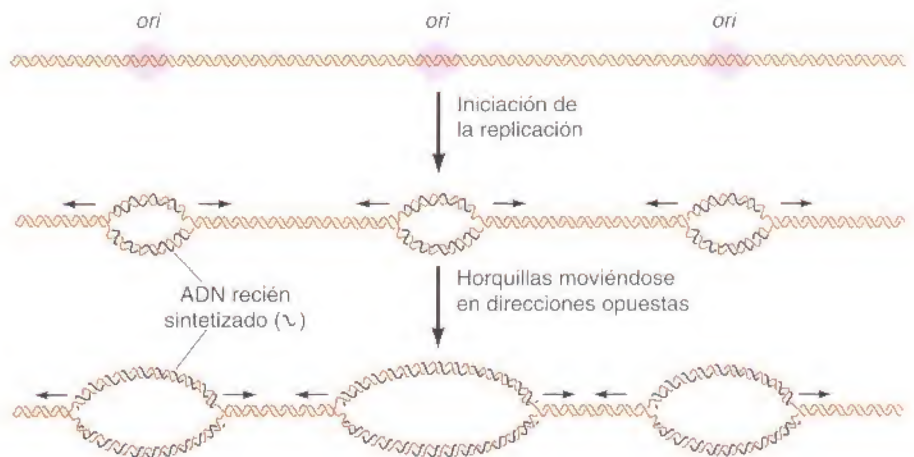



*Figura 5.14*
**Orígenes de replicación en los cromosomas eucariotas.** La replicación se inicia en múltiples orígenes (*ori*), cada uno de los cuales produce dos horquillas de replicación.

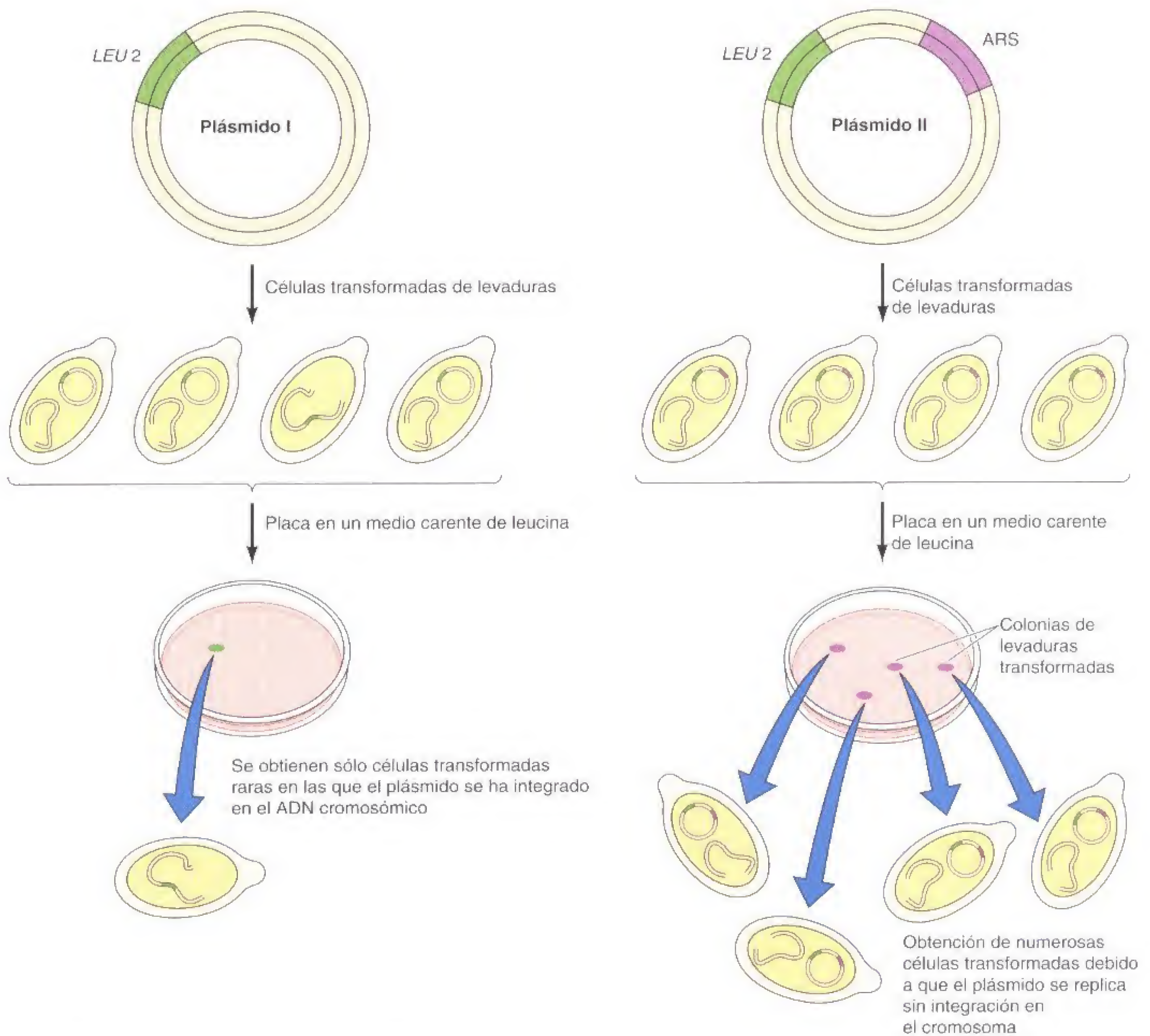



*Figura 5.15*
**Identificación de los orígenes de replicación en levaduras.** Los plásmidos I y III contienen un gen marcador selectivo (LEU 2) que permite a las células transformadas crecer en un medio carente de leucina. Solamente el plásmido II contiene un origen de replicación (ARS). La transformación de las levaduras con el plásmido I produce exclusivamente células transformadas raras en las que el plásmido se ha integrado en el ADN cromosómico. El plásmido II, sin embargo, es capaz de replicarse sin la integración en el cromosoma de la levadura (replicación autónoma), de manera que se obtiene un número mayor de células transformadas a partir de su introducción en las células de levaduras.

*S. pombe* carecen del sitio de unión claramente definido para ORC que poseen los elementos ARS de *S. cerevisiae*, pero contienen repeticiones de secuencias ricas en AT que parecen actuar como puntos de unión para el complejo ORC de *S. pombe*. Se ha encontrado que un origen de replicación de *Drosophila* abarca 2 kb de ADN y contiene varios puntos de unión de ORC, pero estas secuencias no se han definido. En mamíferos, algunos orígenes se han localizado en pocas kb de ADN. En otros casos, sin embargo, la replicación puede iniciarse en múltiples orígenes con grandes «zonas de iniciación» que abarcan de 10 a 50 kb. Así, parece que las secuencias que definen los orígenes de replicación varían mucho entre eucariotas, aunque el papel de las proteínas ORC como iniciadores de replicación se encuentra altamente conservado.

## *Telómeros y telomerasa: replicación de los extremos de los cromosomas*

Debido a que las ADN polimerasas sólo extienden los cebadores en sentido de 5′ a 3′, son incapaces de copiar los extremos 5′ de las moléculas lineales de

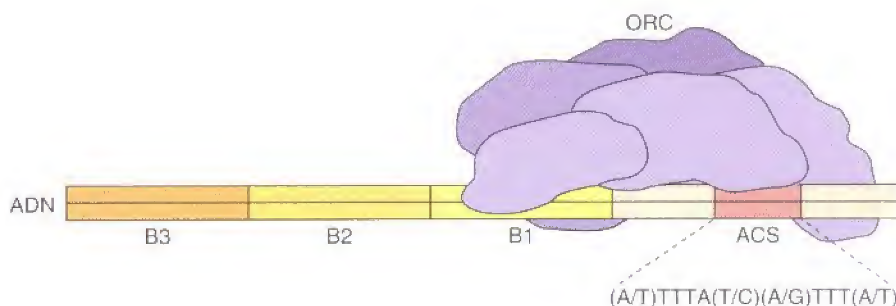



*Figura 5.16*
**Elemento ARS de levaduras.** El elemento contiene una secuencia consenso ARS de 11 pares de bases (ACS), que es el sitio de unión específico para el complejo del origen de replicación (ORC). Otros tres elementos adicionales (B1, B2 y B3) que individualmente no son esenciales, contribuyen a la función de ARS.

ADN. Como consecuencia, se requieren mecanismos especiales para replicar las secuencias terminales de los cromosomas lineales de las células eucariotas. Estas secuencias (**telómeros**) se componen de repeticiones en tándem de secuencias simples de ADN (véase Cap. 4). Son replicadas por la acción de una enzima única llamada **telomerasa**, que es capaz de mantener a los telómeros catalizando de su síntesis en ausencia de una hebra molde de ADN.

La telomerasa es una **transcriptasa inversa**, una de las clases de las ADN polimerasas, descubiertas por primera vez en retrovirus (véase Cap. 3), que sintetizan ADN a partir de un molde de ARN. Cabe destacar que la telomerasa porta su propio molde de ARN, que es complementario a las secuencias repetidas de los telómeros, como parte del complejo enzimático. El uso de este ARN como molde permite a la telomerasa generar múltiples copias de las secuencias repetidas teloméricas, manteniendo por tanto a los telómeros en la ausencia de un molde de ADN convencional para dirigir su síntesis.

El mecanismo de acción de la telomerasa fue descubierto en 1985 por Carol Greider y Elisabeth Blackburn con los estudios del protozoo *Tetrahymena* (Fig. 5.17). La telomerasa de *Tetrahymena* está unida a un ARN de 159-nucleótidos de longitud que incluye la secuencia 3′-AACCCCAAC-5′. Esta secuencia es complementaria a la repetición telómerica de *Tetrahymena* (5′-TTGGGG-3′) y sirve como molde para la síntesis del ADN telomérico. La utilización de este ARN como molde permite a la telomerasa extender el extremo 3′ del ADN cromosómico una unidad de repetición detrás de su longitud original. La hebra complementaria puede ser entonces sintetizada por el complejo polimerasa $\alpha$-primasa utilizando como iniciador al ARN convencional. La eliminación de los ARN cebadores deja un extremo 3′ del ADN cromosómico suelto, que puede formar lazos al final de los cromosomas eucariotas (véase Fig. 4.22).

La telomerasa ha sido identificada en una gran variedad de eucariotas, y los genes codificadores de los ARN de ésta se han clonado en *Tretahymena*, levaduras, ratones y humanos. En cada caso, el ARN de la telomerasa contiene secuencias complementarias a la secuencia telomérica repetida de este organismo (véase Tabla 4.3). Además, la introducción de genes mutantes del ARN de la telomerasa en levaduras han dado como resultado alteraciones correspondientes a las secuencias cromosómicas teloméricas repetidas, demostrando directamente la función de la telomerasa en el mantenimiento de los extremos de los cromosomas eucariotas.

## Reparación del ADN

El ADN, como cualquier otra molécula, es capaz de participar en diversas reacciones químicas. Debido a que sólo el ADN sirve de copia permanente del genoma celular los cambios en su estructura tienen más transcendencia que alteraciones en otros componentes celulares, como el ARN o las proteínas. Las mutaciones pueden surgir de la incorporación de bases incorrectas durante la replicación del ADN. Además, se producen diversos cambios bien espontáneos

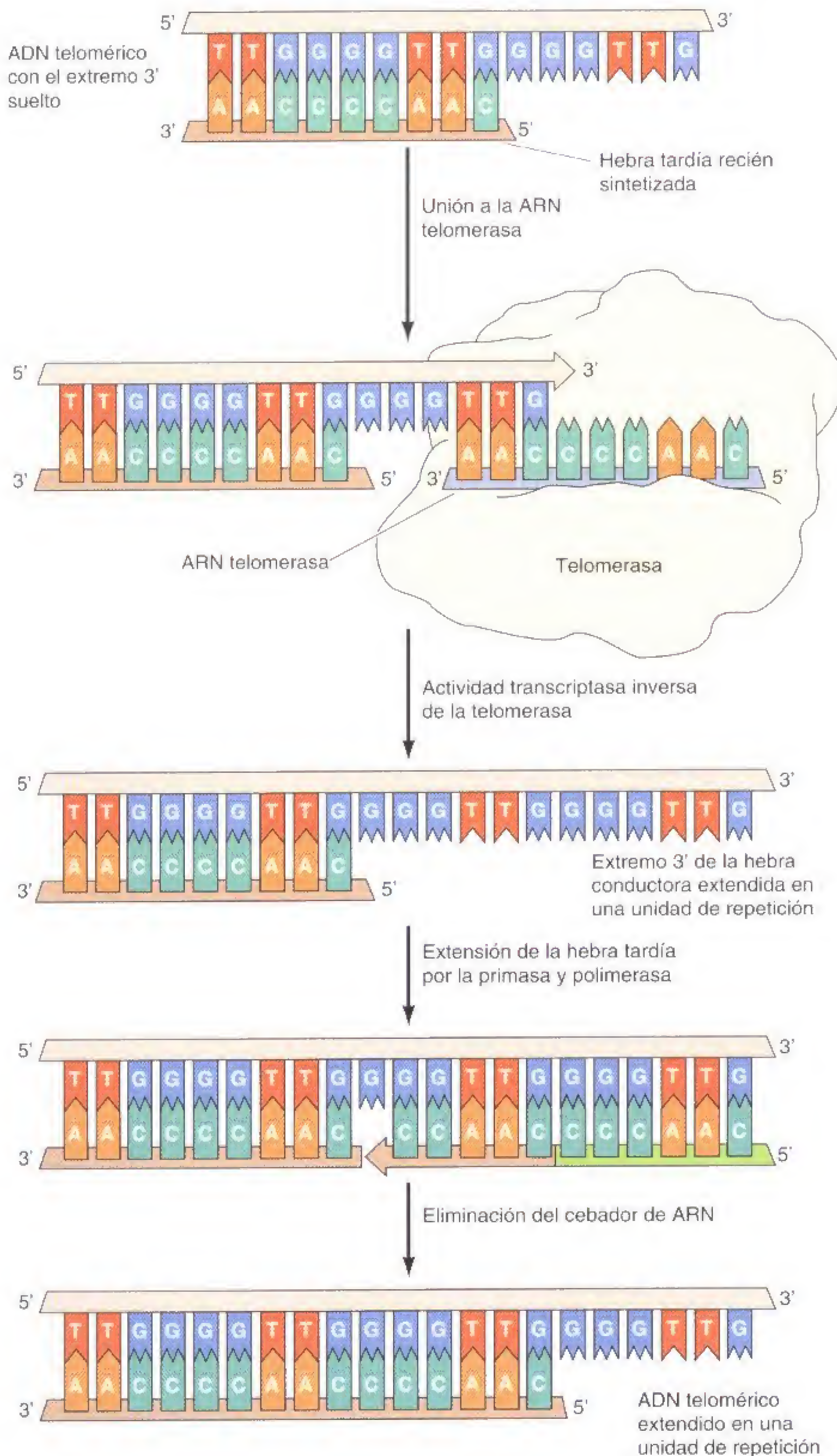



*Figura 5.17*
**Acción de la telomerasa.** El ADN telomérico es una secuencia repetida simple con un extremo 3' suelto en la hebra conductora recién sintetizada. La telomerasa lleva consigo su propia molécula de ARN, que es complementaria al ADN telomérico, como parte del complejo enzimático. El extremo suelto del ADN telomérico se une al ARN de la telomerasa, que luego servirá como molde para la extensión de la hebra conductora en una unidad más de repetición. La hebra tardía del ADN telomérico puede ser a su vez sintetizada mediante iniciación convencional de ARN y actividad polimerasa del ADN.

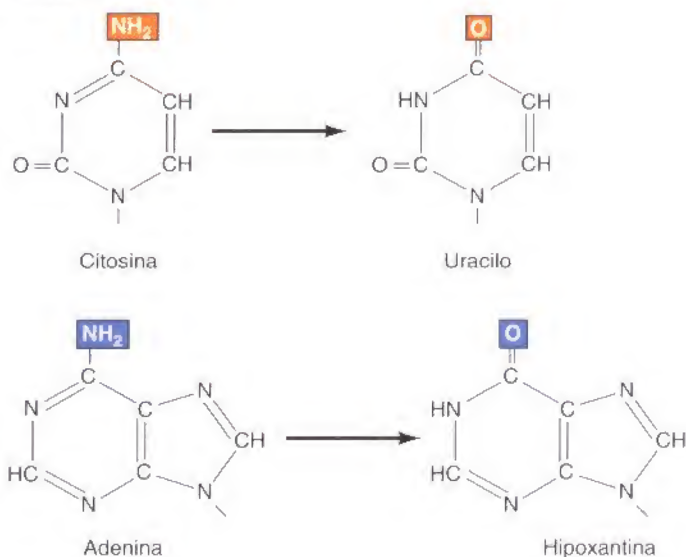
(Fig. 5.18) o como resultado de la exposición a agentes químicos o radiación (Fig. 5.19). Este tipo de daños en el ADN pueden bloquear la replicación o la transcripción, pudiendo dar lugar a una alta frecuencia de mutaciones-consecuencias que son inaceptables desde el punto de vista de la reproducción celular. Para mantener la integridad de sus genomas, las células han tenido por

tanto que desarrollar mecanismos de reparación del ADN dañado. Estos mecanismos de reparación del ADN se pueden dividir en dos clases principales: (1) inversión directa de la reacción química responsable del daño al ADN, y (2) eliminación de las bases dañadas seguida de su reposición con ADN recién sintetizado. Allá donde la reparación del ADN falla, las células han desarrollado mecanismos adicionales que permiten a estas acabar con los daños.

### *Inversión directa del ADN dañado*

La mayoría de los daños producidos en el ADN son reparados mediante la eliminación de las bases dañadas seguida de la síntesis de la región escindida. Algunas lesiones en al ADN, sin embargo, se pueden reparar mediante inversión directa del daño, pudiendo ser un camino más eficiente a la hora de tratar con tipos específicos de daños al ADN que se dan con frecuencia. Tan solo ciertos tipos de daños al ADN se reparan de esta forma, en particular los dímeros de pirimidina que resultan de la exposición a la luz ultravioleta (UV) y los residuos de guanina alquilada que se han modificado por la adición de grupos metilos y etilos en la posición $O^6$ del anillo de purina.

La luz UV es una de las fuentes más importantes de daño al ADN y también es la forma más estudiada de ADN dañado en términos de mecanismos de repa-



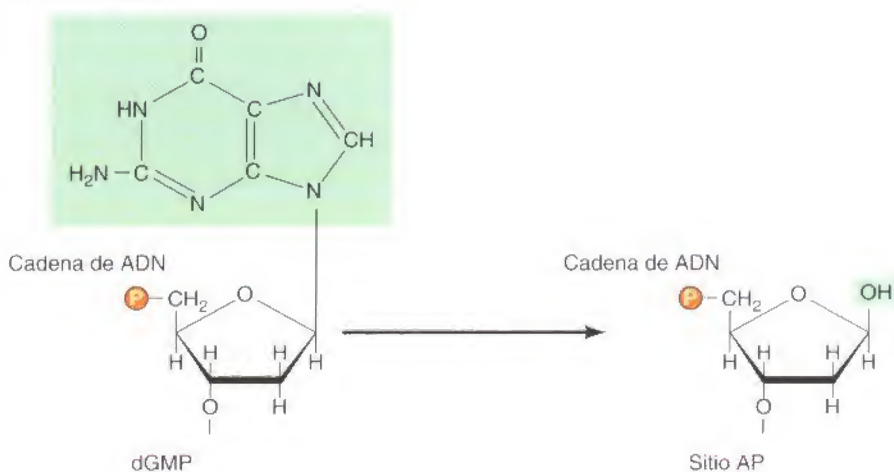
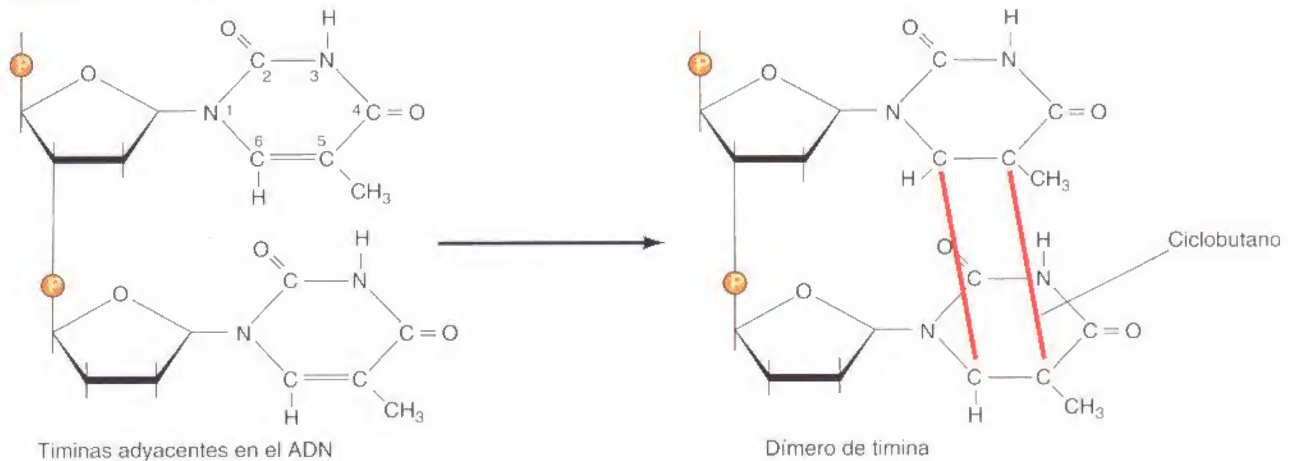
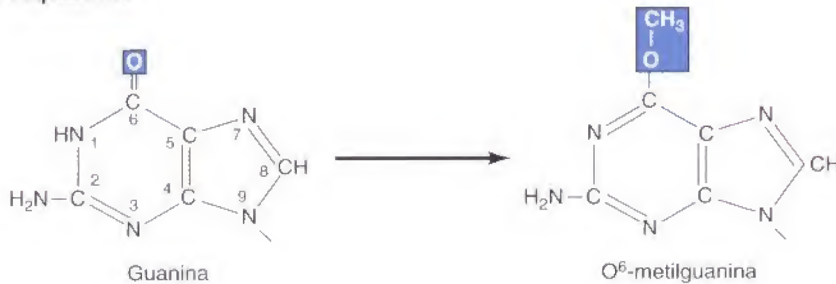
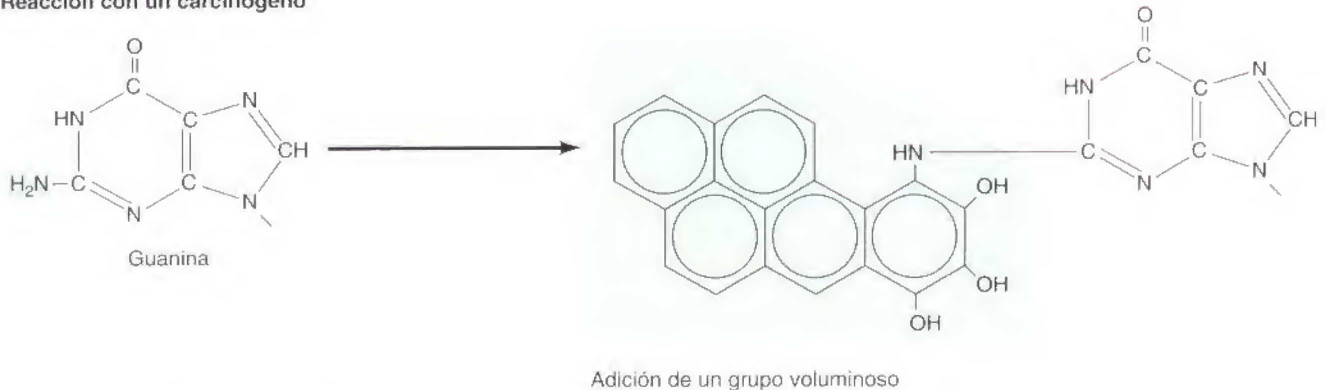




*Figura 5.18*
**Daño espontáneo del ADN.** Existen dos formas fundamentales de daño espontáneo del ADN: (A) desaminación de adenina, citosina y guanina, y (B) depurinación (pérdida de bases de purina) a causa de la rotura del enlace entre las bases de purina y la desoxirribosa, dejando un sitio apurínico (AP) en el ADN. dGMP = desoxiguanosina monofosfato.




ración. Su importancia se ilustra por el hecho de que la exposición a la radiación solar UV es la causa de la mayoría de los cánceres de piel humanos. El principal tipo de daño inducido por la luz UV es la formación de **dímeros de pirimidina**, en los que las pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN están unidas por la formación de un anillo de ciclobutano que resulta de la saturación de los dobles enlaces entre el carbono 5 y el 6 (véase Fig. 5.19A). La formación de dichos dímeros distorsiona la estructura de la cadena de ADN y bloquea la transcripción o replicación al pasar por el daño, de manera que su reparación esta relacionada con la capacidad de las células para sobrevivir a la radiación. Uno de los mecanismos de reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por UV es la inversión directa de la reacción de dimerización. El proceso se denomina **fotorreactivación** puesto que la energía derivada de la luz visible se utiliza para romper el anillo ciclobutano (Fig. 5.20). Las bases originales de pirimidina continúan en el ADN, ahora repuestas a su estado normal. Tal y como se esperaría del hecho de

*Figura 5.19*
**Ejemplos de daños al ADN inducidos por radiación y agentes químicos.** (A) La luz UV induce la formación de dímeros de pirimidina, en los que dos pirimidinas adyacentes (p. ej., timinas) se unen mediante un ciclobutano en estructura de anillo. (B) La alquilación es la adición de grupos metilo o etilo en posiciones diversas en las bases de ADN. En este ejemplo, la alquilación de la guanina en posición $O^6$ da lugar a la formación de una $O^6$-metilguanina. (C) Muchos carcinógenos (p. ej., benzo-(*a*)pireno) reaccionan con las bases del ADN, produciendo la adición de grupos químicos voluminosos a la molécula de ADN.

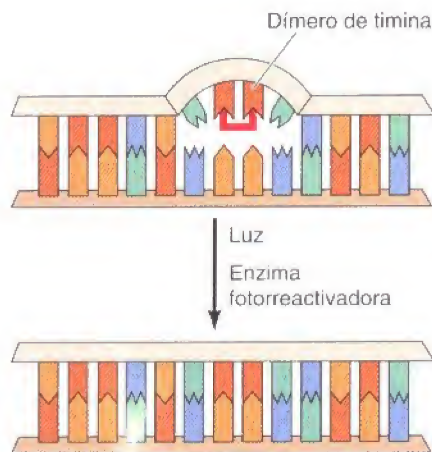



*Figura 5.20*
**Reparación directa de un dímero de timina.** Los dímeros de timina inducidos por la radiación UV se pueden reparar mediante fotorreactivación, en la que la energía procedente de la luz visible se utiliza para dividir los enlaces formados en el anillo de ciclobutano.

que la radiación solar UV es la fuente principal de daños al ADN en diversos tipos de células, la reparación por fotoactivación de los dímeros de pirimidina es común en una variedad de células procariotas y eucariotas, incluyendo *E. coli*, levaduras, y algunas especies de plantas y animales. Curiosamente, sin embargo, la fotorreactivación no es universal; muchas especies (incluyendo los humanos) carecen de este mecanismo de reparación del ADN.

Otra forma de reparación directa corresponde al daño producido por la reacción entre agentes alquilantes y el ADN. Los agentes alquilantes son compuestos reactivos que son capaces de transferir grupos metilo y etilo a una base de ADN, modificando por tanto químicamente la base (véase Fig. 5.20B). Un tipo de daño particularmente importante es la metilación de la guanina en posición $O^6$, debido a que el producto, $O^6$-metilguanina, forma pares de bases complementarias con timina en lugar de citosina. Esta lesión puede ser reparada por una enzima (llamada $O^6$-metilguanina metiltransferasa) que transfiere el grupo metilo desde la $O^6$-metilguanina al sitio activo de un residuo de cisteína (Fig. 5.21). Por tanto se elimina la modificación química mutagénica potencial, y se restaura la guanina original. Las enzimas que catalizan esta reacción directa de reparación se encuentran en abundancia en procariotas y eucariotas, incluidos los humanos.

## *Reparación por escisión*

Aunque la reparación directa es una manera eficiente de tratar con tipos particulares de daños al ADN, la reparación por escisión abarca la reparación de gran variedad de alteraciones químicas en el ADN. En consecuencia, los diferentes tipos de reparación por escisión son los mecanismos más importantes de repara-

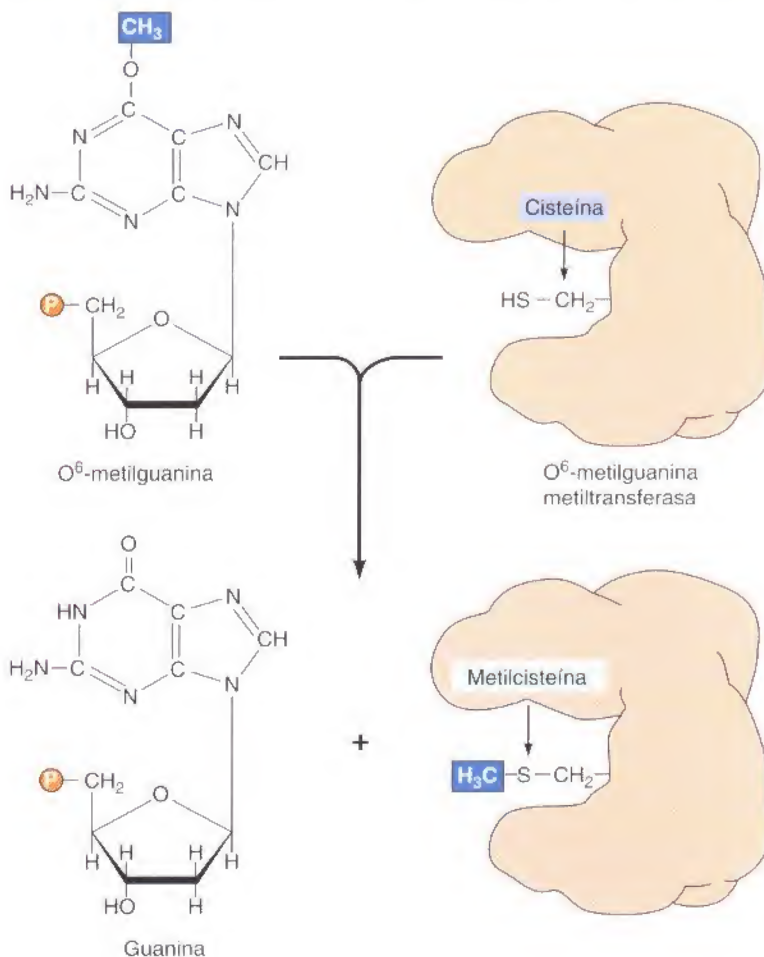



*Figura 5.21*
**Reparación de una $O^6$-metilguanina.** Una $O^6$-metilguanina metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la $O^6$-metilguanina a un residuo de cisteína en el sitio de activación de la enzima.

ción del ADN en las células procariotas y eucariotas. En la reparación por escisión, el ADN dañado es reconocido y eliminado, como bases independientes o como nucleótidos. El espacio vacío generado se rellena con la síntesis de una nueva hebra de ADN, utilizando la hebra complementaria no dañada como molde. Los tres tipos de reparación por escisión —reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido y reparación del desapareamiento— permiten a las células resolver una variedad de tipos diferentes de ADN dañado.

La reparación de un ADN que contiene uracilo es un buen ejemplo de la **reparación por escisión de base**, en la que bases dañadas de forma única son reconocidas y eliminadas de la molécula de ADN (Fig. 5.22). El uracilo puede surgir en el ADN por dos mecanismos: (1) el uracilo (como dUTP [desoxiuridina trifosfato]) se incorpora ocasionalmente en el lugar de una timina durante la síntesis del ADN, y (2) el uracilo se puede formar en el ADN por la desaminación de una citosina (véase Fig. 5.18A). El segundo mecanismo es de mayor importancia biológica puesto que altera el patrón normal de pares de bases complementarias lo que representa un acontecimiento mutagénico. La escisión del uracilo en el ADN esta catalizada por la **ADN glicosilasa**, una enzima que rompe el enlace de unión de la base de uracilo con el esqueleto de desoxirribosa del ADN. Esta reacción produce un uracilo libre y un sitio apirimidínico —un azúcar sin base—. La ADN glucosilasa también reconoce y elimina otras bases anómalas, incluyendo la hipoxantina formada por la desaminación de adenina, dímeros de pirimidina, purinas alquiladas distintas que la $O^6$-alquilguanina, y bases dañadas por oxidación o radiación ionizante.

El resultado de la acción de la ADN glicosilasa es la formación de un sitio apirimidínico o apurínico (generalmente llamado sitio AP) en el ADN. Se forman sitios AP similares como resultado de la pérdida espontánea de bases de purina (véase Fig. 5.18B), que se da en proporciones significativas bajo condiciones celulares normales. Por ejemplo, cada célula en el cuerpo humano se estima que pierde varios miles de bases de purina diariamente. Estos sitios son reparados por la **AP endonucleasa**, que rompe de forma adyacente al sitio AP (véase Fig. 5.22). La desoxirribosa restante por tanto se elimina, y el espacio de una sola base resultante es rellenado por la ADN polimerasa y la ligasa.

Mientras que la ADN glicosilasa reconoce solamente formas específicas de bases dañadas, otro sistema de reparación reconoce a una gran variedad de bases dañadas que distorsionan a la molécula de ADN, incluyendo dímeros de pirimidina inducidos por UV y grupos voluminosos añadidos a las bases de ADN como resultado de la reacción de muchos carcinógenos con el ADN (véase Fig. 5.19C). Esta forma tan extendida de reparación del ADN se conoce como **reparación por escisión de nucleótidos**, debido a que las bases (p. ej., un dímero de timina) son eliminadas como parte de un oligonucleótido que contiene la lesión (Fig. 5.23).

En *E. coli*, la reparación por escisión de nucleótidos esta catalizada por los productos de tres genes (*uvrA, B, C*) que fueron identificados debido a que las mutaciones en estos *loci* resultan extremadamente sensibles a la luz UV. La proteína UvrA reconoce al ADN dañado y recluta a UvrB y UvrC al sitio de la lesión. UvrB y UvrC entonces rompen los extremos 3′ y 5′ del sitio dañado, respectivamente, y por tanto escinden un oligonucleótido que consiste en 12 ó 13 bases. El complejo UvrABC con frecuencia se denomina **escinucleasa**, un nombre que refleja su capacidad para escindir un oligonucleótido. Posterior-

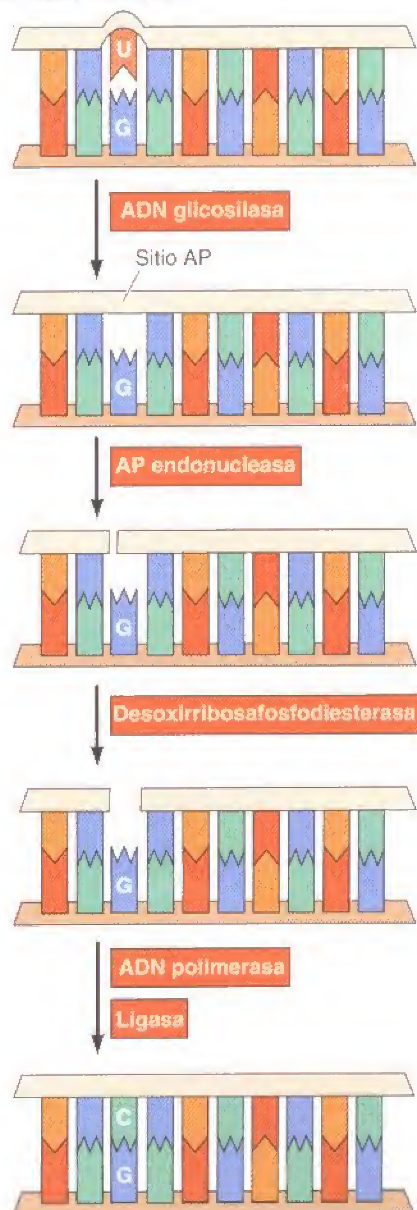



*Figura 5.22*
**Reparación por escisión de bases.** En este ejemplo, el uracilo (U) se ha formado por desaminación de la citosina (C) y es por tanto opuesto a una guanina (G) en la hebra complementaria del ADN. El enlace entre el uracilo y la desoxirribosa lo rompe una ADN glicosilasa, dejando un azúcar sin base unido al ADN (un sitio AP). El sitio es reconocido por una AP endonucleasa, que rompe la cadena de ADN. La desoxirribosa restante es eliminada por la desoxirribosafosfodiesterasa. El espacio que resulta lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa, conduciendo a la incorporación de la base correcta (C) opuesta a G.

mente se requiere la acción de una helicasa para eliminar al oligonucleótido que contiene el daño de la molécula de ADN de doble hélice, y el espacio resultante será rellenado por la ADN polimerasa I y unido por la ligasa.

Los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos se han estudiado extensamente en eucariotas, en particular en levaduras y en humanos. En levaduras, como ocurre en *E. coli*, se han identificado diversos genes implicados en la reparación del ADN (llamados genes *RAD* por sensibles a la *rad*iación) mediante el aislamiento de mutantes con sensibilidad aumentada a la luz UV. En humanos, los genes de la reparación del ADN se han identificado mediante el estudio de individuos que sufren de enfermedades hereditarias que resultan de las deficiencias en la capacidad de reparar el ADN dañado. De estas enfermedades la más estudiada es el xeroderma pigmentosum (XP), un desorden genético raro que afecta aproximadamente a uno de cada 250.000 individuos. Los individuos con esta enfermedad son extremadamente sensibles a la luz UV y desarrollan múltiples cánceres de piel en las regiones del cuerpo que están expuestas a la luz solar. En 1968 James Cleaver hizo el descubrimiento clave de que las células en cultivo de pacientes con XP tenían deficiencias en llevar a cabo el sistema de

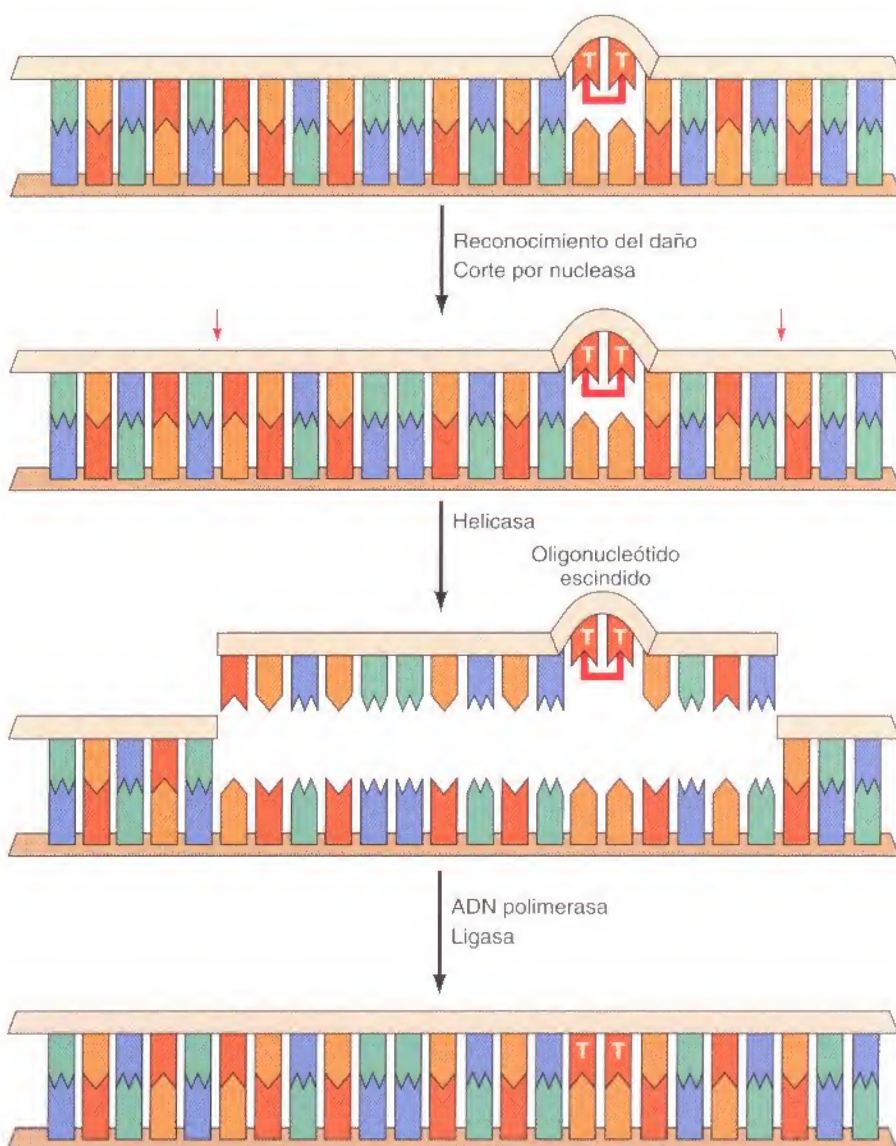



*Figura 5.23*
**Reparación por escisión de nucleótidos de los dímeros de timina.** El ADN dañado es reconocido y después cortado a ambos lados del dímero de timina por las nucleasas 3′ y 5′. El desenrollamiento por una helicasa produce la escisión de un oligonucleótido que contiene las bases dañadas. El espacio resultante lo rellena la ADN polimerasa y lo une una ligasa.

reparación por escisión de nucleótidos. Esta observación no solo proporcionó la primera conexión entre la reparación del ADN y el cáncer, sino que sugirió el uso de células XP como sistema experimental para identificar a los genes humanos reparadores del ADN. La identificación de los genes humanos reparadores del ADN se ha llevado a cabo mediante estudios no solo con células XP, sino con otras dos enfermedades humanas que resultan de defectos en la reparación del ADN (Síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia) y con mutantes sensibles a UV procedentes de líneas celulares de roedores. La disponibilidad de células de los mamíferos con defectos en la reparación del ADN ha permitido la clonación de genes reparadores basada en la capacidad de los alelos de tipo salvaje de restaurar la sensibilidad normal al UV en las células mutantes mediante ensayos de transferencia de genes, dejando una puerta abierta a los análisis experimentales de reparación por escisión de nucleótidos en las células de los mamíferos.

La clonación molecular hasta ahora ha identificado siete genes de reparación diferentes (designados desde *XPA* hasta *XPG*) que mutados en los casos de xeroderma pigmentosum, como en algunos casos de síndrome de Cockayne, tricotiodistrofia, y mutantes sensibles a la radiación UV de células de roedores. Las proteínas codificadas por estos genes de reparación del ADN de mamíferos están muy relacionadas con las proteínas codificadas por los genes *RAD* de levaduras, lo que indica que la reparación por escisión de nucleótidos está muy conservada entre los eucariotas. Con la disponibilidad de genes de reparación de levaduras y mamíferos clonados, ha sido posible purificar las proteínas que codifican y desarrollar sistemas *in vitro* para estudiar sus papeles en el proceso de reparación (Figura 5.24). El paso inicial de la reparación por escisión en las células de mamífero implica el reconocimiento de un fallo en el apareamiento de bases mediante un complejo formado por XPC y una proteína denominada hHR23B, que es un homólogo de la proteína Rad23 de levaduras. Esto es seguido del reclutamiento de las proteínas XPB, XPD y XPG al ADN afectado. Las proteínas XPB y XPD son componentes de un factor de transcripción de múltiples subunidades (denominado TFIIH) necesario para iniciar la transcripción de los genes eucarióticos (véase Capítulo 6); actúan como helicasas para desenrollar aproximadamente 30 pares de bases de ADN en torno al punto dañado. La proteína XPA entonces actúa para confirmar el daño, y recluta a XPF como un heterodímero con ERCC1 (proteína de reparación identificada en células de roedores sensibles a la radiación UV) al complejo de reparación. XPF/ERCC1 y XPG son endonucleasas, que escinden el ADN en los extremos 5′ y 3′ del punto dañado, respectivamente. Esta escisión libera un oligonucleótido que está formado por aproximadamente 30 bases. El hueco resultante es ahora rellenado por la ADN polimerasa $\delta$ o $\varepsilon$ (en asociación con RFC y PCNA) y sellado por la ligasa.

Mientras que el complejo XPC/hHR23B puede reconocer el ADN dañado a lo largo del genoma, una forma alternativa de reparación por escisión de nucleótidos, denominada **reparación acoplada a la transcripción**, se dedica específicamente a la reparación del daño en el interior de genes activamente transcritos. Una conexión entre la transcripción y la reparación fue sugerida en primer lugar por experimentos que demostraban que las hebras transcritas de ADN se reparan más rápido que las hebras no transcritas, tanto en *E. coli* como

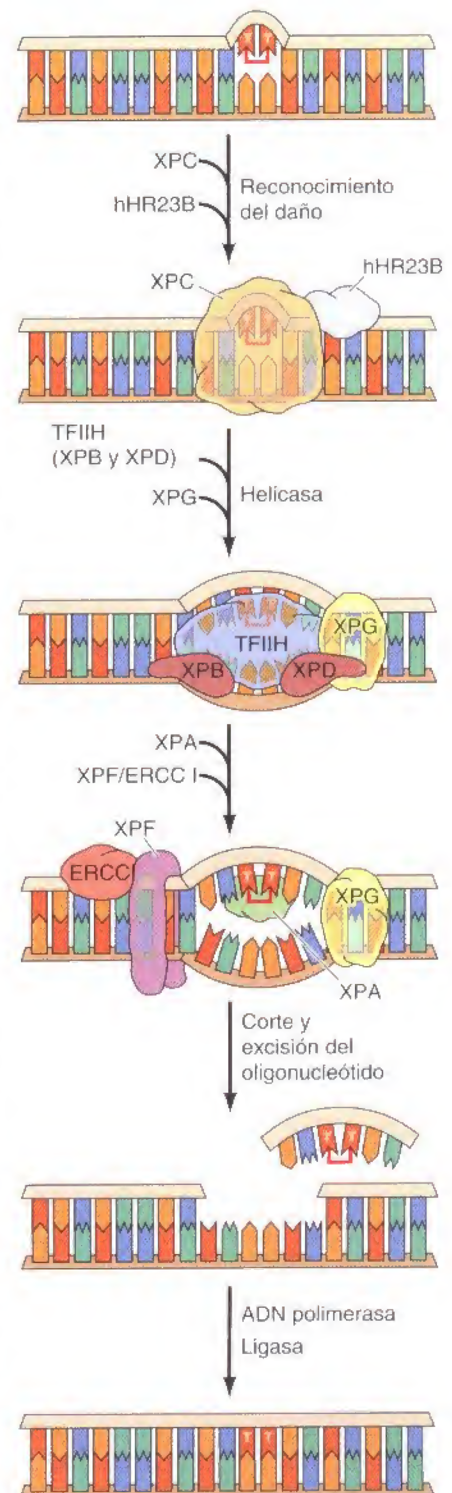



*Figura 5.24*
**Reparación por escisión de nucleótidos en células de mamífero.** El daño del ADN (p. ej., un dímero de timina) es reconocido por el complejo XPC/hHR23B. El factor de transcripción TFIIH, que contiene las helicasas XPB y XPD y XPG son reclutados al ADN dañado. Después del desenrollamiento del ADN por parte de XPB y XPD, el daño es confirmado por XPA y entonces es reclutado el complejo XPF/ERCC1. A continuación el ADN es escindido por las endonucleasas XPF/ERCC1 y XPG, escindiendo el oligonucleótido dañado. El hueco resultante es rellenado por la ADN polimerasa y sellado por la ligasa.

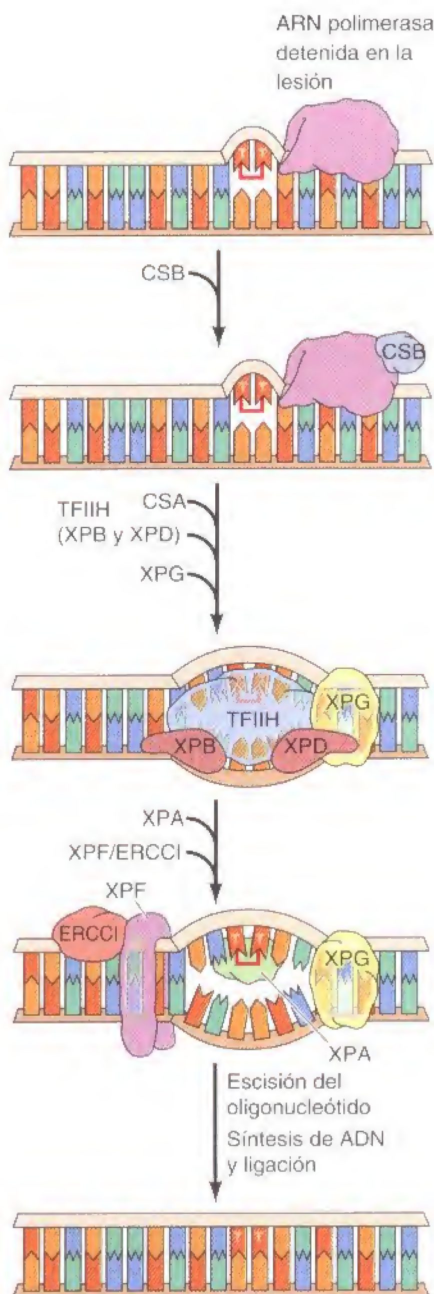



*Figura 5.25*
**Reparación acoplada a la transcripción en células de mamífero.** La ARN polimerasa se detiene en la lesión de la hebra de ADN que se transcribe. La ARN polimerasa detenida es reconocida por las proteínas de reparación acopladas a la transcripción CSA y CSB, que reclutan a TFIIH y XPG al ADN dañado. La reparación entonces procede por la vía de reparación por escisión general.

en células de mamífero. Ya que el ADN dañado bloquea la transcripción, se cree que esta reparación acoplada a la transcripción resulta ventajosa permitiendo que la célula repare preferentemente el daño a genes que se expresan activamente. En *E. coli*, el mecanismo de reparación acoplado a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa detenida en la lesión de la hebra de ADN que se está transcribiendo. La ARN polimerasa detenida es reconocida por una proteína denominada factor de reparación acoplado a la transcripción, que desplaza a la ARN polimerasa y recluta la escinucleasa UvrABC al sitio dañado.

En células de mamífero, la reparación acoplada a la transcripción implica el reconocimiento de la ARN polimerasa detenida, por parte de las proteínas CSA y CSB, que están codificadas por los genes responsables del síndrome de Cockayne (Fig. 5.25). En contraste con pacientes con xeroderma pigmentosum, los pacientes con el síndrome de Cockayne son específicamente deficientes en la reparación acoplada a la transcripción, lo que resulta consecuente con el papel de CSA y CSB como factores de reparación acoplada a la transcripción. CSA y CSB actúan análogamente al complejo XPC/hHR23B en el reclutamiento de XPA y el complejo XPF/ERCC1, y a la escisión del oligonucleótido dañado. La reparación acoplada a la transcripción ahora procede de forma similar a la reparación por escisión de nucleótidos general, excepto por el reconocimiento inicial de la ARN polimerasa detenida por parte de CSA y CSB, en lugar de su reconocimiento directo por el complejo XPC/hHR23B.

Un tercer sistema de reparación reconoce a las bases no complementarias que se incorporan durante la replicación del ADN. Muchas de estas bases no complementarias se eliminan por la actividad de la doble lectura de la ADN polimerasa. Las que se pierden son el objetivo de una corrección posterior por parte del sistema de **reparación no complementaria**, que barre de nuevo al ADN replicado. Si se encuentra una no-complementariedad, las enzimas de este sistema de reparación son capaces de identificar y escindir la base no complementaria específicamente de la hebra de ADN recién replicada, permitiendo que se corrija el error y la secuencia original sea reemplazada.

En *E. coli*, la capacidad del sistema de reparación no complementaria para distinguir la hebra de ADN parental de la hebra de ADN recién sintetizada se basa en el hecho de que el ADN de esta bacteria se modifica por la metilación de los residuos de adenina en la secuencia GATC para formar 6-metiladenina (Fig. 5.26). Puesto que la metilación ocurre después de la replicación, las hebras de ADN recién sintetizadas, no están metiladas y pueden ser reconocidas específicamente por las enzimas del sistema de reparación no complementaria. La reparación no complementaria se inicia con la proteína MutS, que reconoce la no-complementariedad y forma un complejo con otras dos proteínas llamadas MutL y MutH. La endonucleasa MutH rompe la hebra de ADN sin metilar en la secuencia GATC. MutL y MutS actúan después juntas con una exonucleasa y una helicasa para escindir el ADN entre la «brecha» de la hebra y la no-complementariedad, dejando un espacio que lo rellenaran la ADN polimerasa y la ligasa.

Los eucariotas tienen un sistema de reparación no complementaria similar, aunque el mecanismo por el que las células eucariotas identifican al ADN recién sintetizado es distinto al usado por *E. coli*. En las células de los mamíferos, parece ser que la especificidad de la hebra para la reparación no complementaria no está determinada por la metilación del ADN. En su lugar, está determinada por la presencia de roturas de hebra simple (que estarán presentes en el

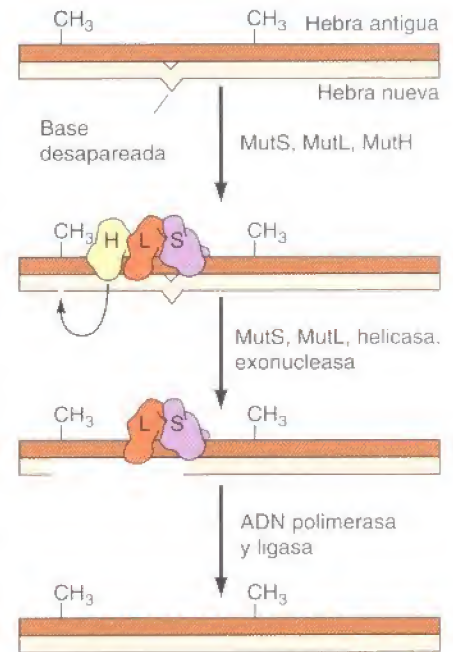



*Figura 5.26*
**Reparación de apareamientos en *E. coli.*** El sistema de reparación de apareamientos detecta y escinde las bases despareadas en el ADN recién replicado, que se diferencia de la hebra parental debido a que todavía no ha sido metilada. MutS se une a la base desapareada, seguido de MutL. La unión a MutL activa a MutH, que rompe a la hebra no modificada opuesta al sitio de la metilación. MutS y MutL, junto con una helicasa y una exonucleasa, escinden la porción de la hebra no modificada que contiene el desapareamiento. La ADN polimerasa rellena el espacio que finalmente queda unido por la ligasa.

ADN recién replicado) o asociaciones con los homólogos eucarióticos de MutS y MutL con la maquinaria de replicación, pueden especificar la hebra a reparar. A continuación, los homólogos eucariotas de MutS y MutL se unen a la base no complementaria y escinden al ADN entre la rotura de la hebra y la base no complementaria, como en *E. coli*. La importancia de este sistema de reparación se verifica dramáticamente por el hecho de que mutaciones en los homólogos humanos de *MutS* y *MutL* son responsables de un tipo de cáncer de colon hereditario (cáncer colorrectal hereditario no poliposo, o HNPCC). HNPCC es una de las enfermedades hereditarias más comunes; afecta a uno de cada 200 individuos y es responsable del 15% de todos los cánceres colorrectales en los Estados Unidos. La relación entre el HNPCC y los defectos de la reparación no complementaria se descubrió en 1993, cuando dos grupos de investigación clonaron al homólogo humano de *MutS* y encontraron que las mutaciones en este gen eran las responsables de casi la mitad de todos los casos de HNPCC. Estudios posteriores han demostrado que la mayoría de los casos restantes de HNPCC están causados por mutaciones en uno de los tres genes humanos que son homólogos a *MutL*. Defectos en estos genes parecen resultar en una elevada frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, con una elevada probabilidad correspondiente de que alguna de estas mutaciones finalmente desencadene el desarrollo de cáncer.

## *Reparación propensa al error*

Los sistemas de reversión directa y la reparación por escisión actúan para corregir daños del ADN antes de la replicación, para que la síntesis de ADN replicativo pueda proceder empleando una hebra de ADN no dañada como molde. Si estos sistemas fallasen, sin embargo, la célula posee mecanismos alternativos para tratar el ADN dañado en la horquilla de replicación. Los dímeros de pirimidina y muchos otros tipos de lesiones no pueden copiarse por la acción normal de las ADN polimerasas, así que la replicación se bloquea en puntos con dichas lesiones. Sin embargo, las células también poseen varias ADN polimerasas especializadas capaces de replicar a través de un punto de ADN dañado. La replicación del ADN dañado por estas polimerasas especializadas puede llevar frecuentemente a la incorporación de bases incorrectas, de modo que esta forma de hacer frente al ADN dañado se denomina **reparación propensa al error**.

La primera ADN polimerasa propensa al error fue descubierta en *E. coli* en 1999. Esta enzima, denominada polimerasa V, es inducida en respuesta a una extensa irradiación UV y puede sintetizar una nueva hebra de ADN opuesta a un dímero de timina (Fig. 5.27). Otras dos ADN polimeras de *E. coli*, las polimerasas II y IV, se inducen de forma similar por el ADN lesionado y funcionan en la reparación propensa al error. Las células eucarióticas también contienen múltiples ADN polimerasas propensas al error, así se han descrito nueve enzimas de este tipo en el hombre hasta la fecha. Todas estas ADN polimerasas propensas al error muestran una baja fidelidad cuando copian ADN no dañado, con tasas de error que oscilan entre 100 y 10.000 veces superior que las tasas de error de las ADN polimerasas replicativas normales (p. ej., la polimerasa III de *E. coli* o las polimerasas $\delta$ y $\varepsilon$ de eucariotas). Además, las polimerasas propensas al

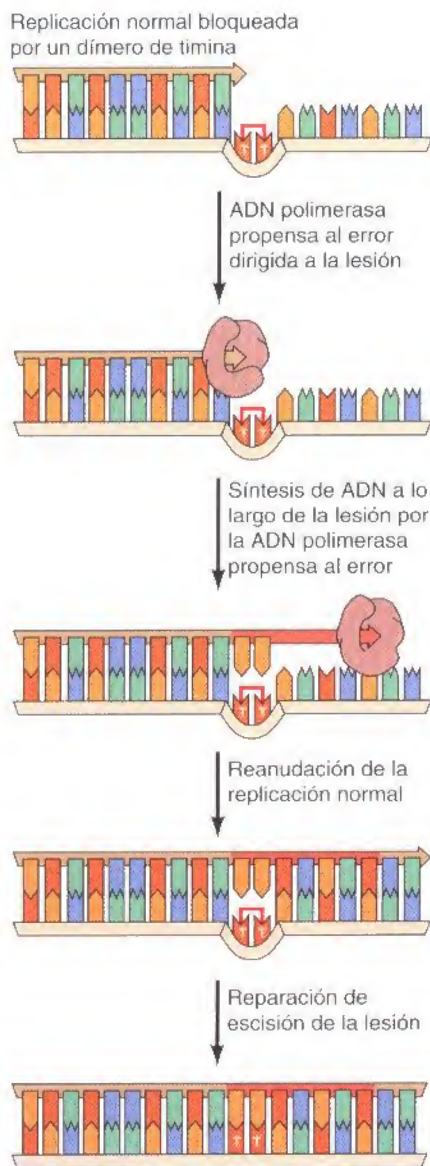



*Figura 5.27*
**Reparación post-replicación.** La presencia de un dímero de timina bloquea la replicación, pero la ADN polimerasa puede esquivar la lesión y reiniciar la replicación en un lugar nuevo curso abajo del dímero. El resultado es un espacio o *gap* opuesto al dímero en la hebra de ADN recién sintetizada. En la reparación recombinatoria, este espacio o *gap* se rellena por la recombinación con la hebra parental sin dañar. Aunque esto deja un espacio en la hebra parental intacta, el espacio o *gap* puede rellenarse mediante la acción de la polimerasa y ligasa, utilizando a la hebra hija intacta como molde. Se forman por tanto dos moléculas intactas de ADN, y el dímero de timina eventualmente puede ser eliminado por escisión.

error carecen de la actividad correctora 3′ → 5′ que caracteriza a las ADN polimerasas replicativas normales (véase Fig. 5.12).

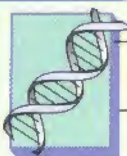
Es importante notar, sin embargo, que las polimerasas propensas al error están especializadas en la inserción de la base correcta opuesta a lesiones específicas en el ADN dañado, y por tanto pueden sintetizar con precisión una nueva hebra empleando algunas formas de ADN dañado como molde. Por ejemplo, la polimerasa V de *E. coli* reconoce específicamente los dímeros de timina e inserta correctamente AA en la hebra opuesta. Por otro lado, la polimerasa V comete una elevada frecuencia de errores cuando sintetiza una nueva hebra de ADN opuesta a otras formas de ADN dañado. Así, estas enzimas son capaces de insertar específicamente las bases correctas opuestas a ciertas formas de lesiones del ADN, aunque son «propensas al error» cuando insertan bases opuestas a otras formas de ADN dañado o en la síntesis de ADN a apartir de un molde de ADN normal no dañado.

## *Reparación recombinatoria*

Otro modo de reparación del ADN, **la reparación recombinatoria**, se basa en la sustitución del ADN dañado mediante la recombinación con una molécula sana. Este mecanismo es utilizado frecuentemente para reparar lesiones encontradas durante la replicación del ADN, donde la presencia de dímeros de timina u otras lesiones que no pueden ser copiadas por las ADN polimerasas replicativas normales bloquean el avance de la horquilla de replicación. La reparación recombinatoria depende del hecho de que una hebra del ADN parental estaba sana y por lo tanto, se copió durante la replicación para dar lugar a una molécula hija normal, que entonces podrá usarse para reparar la hebra dañada.

Los mecanismos moleculares de la reparación recombinatoria no se comprenden por completo y pueden variar entre los distintos tipos celulares, pero se presenta un modelo ilustrativo en la Figura 5.28. En este ejemplo, la replicación normal está bloqueada por la presencia de un dímero de timina en una hebra del ADN. Más adelante del punto dañado, sin embargo, la replicación puede iniciarse de nuevo por la síntesis de un fragmento de Okazaki y puede proceder a lo largo de la hebra molde. El resultado es una hebra hija que posee un hueco opuesto al punto dañado en la hebra parental. La hebra parental sana, que se ha replicado para dar lugar a una molécula hija normal, puede entonces utilizarse para rellenar el hueco opuesto al punto dañado por recombinación entre secuencias homólogas de ADN (véase la siguiente sección). Ya que el hueco resultante en la hebra parental previamente intacta se encuentra frente a una molécula sana, puede ser rellenado por una ADN polimerasa. Aunque la otra molécula parental sigue reteniendo la lesión original (p. ej., un dímero de timina), el daño ahora reside enfrente de una hebra normal y puede tratarse más tarde por reparación por escisión.

La reparación recombinatoria también proporciona un mecanismo principal para la reparación de las roturas de doble hebra, que pueden ser introducidas en el ADN por la radiación ionizante (como los rayos X) y algunos agentes químicos (Fig. 5.29). Ya que este tipo de lesión afecta a ambas hebras de ADN, es especialmente difícil de reparar. La recombinación con secuencias de ADN homólogas sobre un cromosoma sano proporciona un mecanismo de reparación de este tipo de daño y permite restablecer la secuencia normal de ADN. Por otra parte, las roturas de doble hebra pueden repararse simplemente uniendo los extremos rotos de una molécula sencilla de ADN, pero esto desencadena una elevada frecuencia de errores resultantes de la deleción de bases en torno al punto dañado. Debe notarse que los genes responsables del cáncer de mama hereditario (*BRCA1* y *BRCA2*) codifican proteínas implicadas en la reparación de roturas de doble hebra por recombinación homóloga, sugiriendo que defectos en este tipo de reparación del ADN puede llevar al desarrollo de uno de los cánceres más comunes en mujeres.



## Medicina molecular

# Cáncer de colon y reparación del ADN

### La enfermedad

Los cánceres de colon y recto (cánceres colorrectales) son uno de los tipos de cánceres más comunes en los países del oeste, contando con cerca de 14.000 casos de cáncer cada año en los Estados Unidos (aproximadamente un 10 % de la incidencia total del cáncer). La mayoría de los cánceres de colon (al igual que otros tipos de cáncer) no son enfermedades hereditarias; es decir, que no se transmiten directamente de padres a hijos. Sin embargo, se han descrito dos formas hereditarias de cáncer de colon. En estos dos síndromes, la herencia de un gen susceptible al cáncer presenta un potencial muy alto de desarrollar cáncer. Una de las formas heredadas de cáncer de colon (poliposis adenomatosa familiar) es extremadamente rara, representando menos del 1 % de la incidencia total del cáncer de colon. La segunda forma heredada del cáncer de colon (cáncer colorrectal hereditario no poliposo, o HNPCC) es más común y representa alrededor del 15 % de todos los casos cáncer de colon. Además, el HNPCC es una de las enfermedades hereditarias más comunes, afectando a una de cada 200 personas. Aunque los cánceres de colon son la manifestación más clara de esta enfermedad, los individuos afectados también sufren un incremento de la incidencia de otros tipos de cáncer, como son el cáncer de ovario y endometrio.

### Bases moleculares y celulares

Igual que otros cánceres, el cáncer colorrectal es el resultado de mutaciones producidas en genes que regulan la proliferación celular, conduciendo al crecimiento incontrolado de las células cancerígenas. En la mayoría de los casos estas mutaciones ocurren de forma esporádica en las células somáticas. En los cánceres hereditarios, sin embargo, las mutaciones de la línea germinal predisponen al individuo a desarrollar el cáncer.

En 1993 se produjo un avance extraordinario con el descubrimiento de que un gen responsable de aproximadamente el 50 % de los casos de HNPCC codificaba a una enzima implicada en la reparación de los apareamientos en el ADN; este gen es un homólogo humano del gen de *E. coli MutS*. Estudios posteriores han demostrado que otros tres genes, responsables de la mayoría de los casos restantes de HNPCC, son homólogos de *MutL* y que por tanto están implicados en el proceso de reparación de apareamientos. Los defectos en estos genes parecen corresponderse con una alta frecuencia de mutaciones en otros genes celulares, y a su vez con una alta probabilidad de que algunas de estas mutaciones conduzcan eventualmente al desarrollo del cáncer por afectar a genes que regulan la proliferación celular.

### Prevención y tratamiento

De manera similar a otras enfermedades hereditarias, la identificación de los genes responsables de HNPCC permite que los individuos con riesgo de heredar el cáncer sean identificados a través de una prueba genética. Además, el diagnóstico genético prenatal podría ser de vital importancia para los portadores de mutaciones HNPCC que planean tener descendencia. No obstante, los beneficios potenciales de la detección de estas mutaciones no se limitan a prevenir la transmisión de genes mutantes a la siguiente generación; su detección también puede ayudar a prevenir el desarrollo del cáncer en individuos afectados.

En términos de prevención de la enfermedad, una de las características claves del cáncer de colon es su desarrollo gradual durante varios años. El diagnóstico temprano de la enfermedad mejora sustancialmente las posibilidades de supervivencia del paciente. La fase inicial de desarrollo del cáncer de colon es el crecimiento de pequeños pólipos benignos, que con el tiempo se transformaran en malignos e invadirán el tejido conectivo de su alrededor. Anterior al desarrollo de la malignidad, sin embargo, los pólipos se pueden eliminar quirúrgicamente con facilidad, previniendo de forma eficaz el crecimiento de un tumor maligno. Los pólipos y las primeras fases del cáncer de colon se pueden detectar a través del examen del colon con un tubo delgado iluminado (colonoscopia), de manera que la colonoscopia frecuente en pacientes con HNPCC podría permitir la eliminación de los pólipos antes de que el cáncer se desarrolle. Además, diversos medicamentos se han estado probando como inhibidores potenciales del desarrollo del cáncer de colon, pudiendo resultar un gran beneficio para los pacientes con HNPCC. Permitiendo la aplicación controlada de tales medidas preventivas, la identificación de mutaciones responsables de HNPCC podría contribuir de manera significante a la prevención de la enfermedad.



Un pólipo del colon visualizado por colonoscopia. (David M. Martin, MD/SPL/Photo Researches, Inc.)

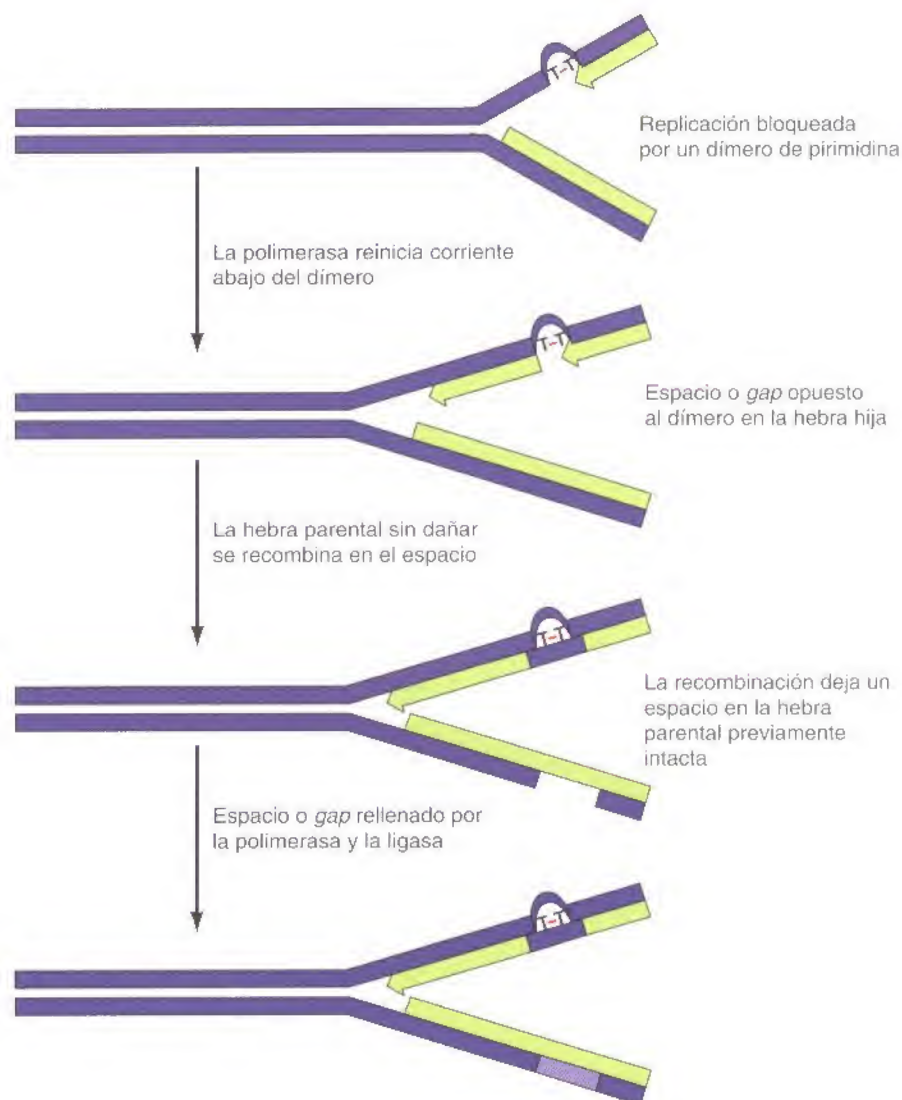



*Figura 5.28*
**Reparación/post-replicación.** La presencia de un dímero de timina bloquea la replicación, pero la ADN polimerasa puede esquivar la lesión y reiniciar la replicación en un lugar nuevo curso abajo del dímero. El resultado es un espacio o *gap* opuesto al dímero en la hebra de ADN recién sintetizada. En la reparación recombinatoria, este espacio o *gap* se rellena por la recombinación con la hebra parental sin dañar. Aunque esto deja un espacio en la hebra parental intacta, el espacio o *gap* puede rellenarse mediante la acción de la polimerasa y ligasa, utilizando a la hebra hija intacta como molde. Se forman por tanto dos moléculas intactas de ADN, y el dímero de timina eventualmente puede ser eliminado por escisión.

## Recombinación entre secuencias homólogas de ADN

La replicación exacta del ADN y la reparación de los daños en el ADN resultan esenciales para el mantenimiento de la información genética y la transmisión fiel de padres a hijos. Desde el punto de vista de la evolución, sin embargo, también ha sido importante generar diversidad genética. Las diferencias genéticas entre los individuos proporcionan el material esencial de partida para la selección natural, que permite a las especies evolucionar y adaptarse a los cambios de las condiciones ambientales. La recombinación juega un papel importante en este proceso permitiendo a los genes distribuirse en diferentes combinaciones. Por ejemplo, la recombinación genética resulta del intercambio de genes entre los pares de cromosomas homólogos durante la meiosis (véase Fig. 3.4). Sin embargo, el aumento de la diversidad genética no es el único papel de la recombinación. Tal y como discutimos en la sección anterior, la recombinación también es un mecanismo importante para la reparación del ADN. Además, la recombinación esta implicada en la reorganización de secuencias específicas de ADN que alteran la expresión y la función de algunos genes durante el desarrollo y la diferenciación. Por tanto, la recombinación desempeña papeles importantes en la vida de las células de un individuo y en la de los organismos, al igual que contribuye a la diversidad genética de las especies.

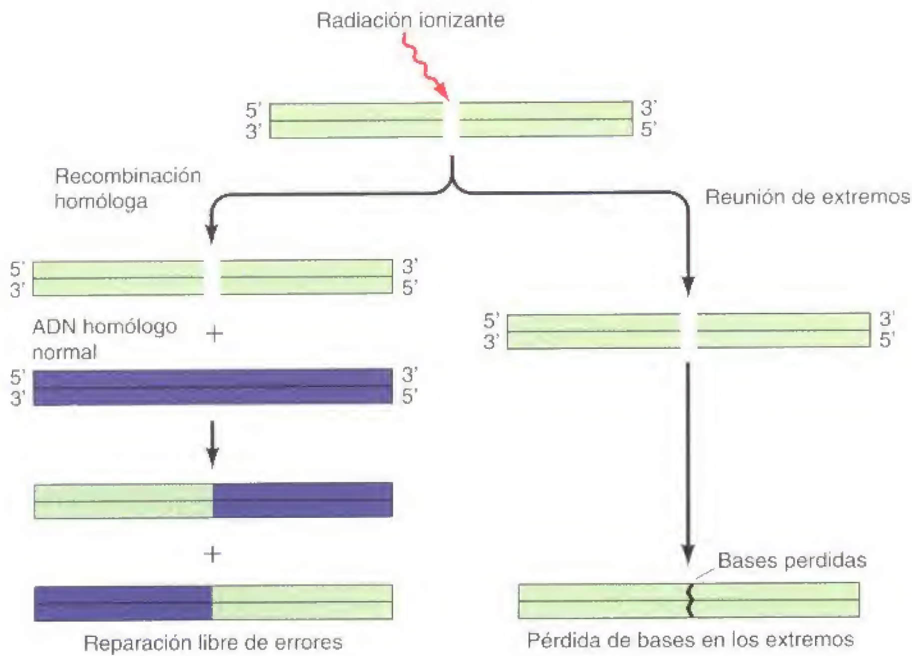



*Figura 5.29*
**Reparación de roturas de doble hebra.** La radiación ionizante y algunos agentes químicos inducen roturas de doble hebra en el ADN. Estas roturas pueden ser reparadas por recombinación homóloga con un cromosoma normal, dando lugar a la restauración de la secuencia original de ADN. Por el contrario, los extremos de la molécula rota pueden ser reunidos, con una frecuente pérdida de bases en torno al punto dañado.

Esta sección discutirá los mecanismos moleculares de la recombinación entre las moléculas de ADN que comparten secuencias homólogas extensas. Los ejemplos incluyen la recombinación entre pares de cromosomas eucariotas durante la meiosis y la recombinación entre cromosomas bacterianos durante la reproducción. Puesto que esta forma de recombinación implica el intercambio de información genética entre dos moléculas homólogas de ADN, no se altera la organización global de los genes en un cromosoma. Otros tipos de recombinación, sin embargo, no requieren secuencias homólogas extensas y por tanto pueden producirse entre moléculas ADN no relacionadas. Este tipo de recombinación conduce a la reorganización de genes, que se discutirá más tarde en este capítulo.

## *Las moléculas de ADN se recombinan mediante roturas y uniones*

La recombinación genética se definió por primera vez tras estudios en *Drosophila*, basados en la observación de que genes en diferentes copias de cromosomas homólogos se podían reorganizar durante la meiosis. Con el descubrimiento posterior de que los genes se componían de ADN, se consideraron dos modelos alternativos para explicar la recombinación a nivel molecular (Fig. 5.30). El modelo «elección de copia» proponía que la molécula recombinante se gene-

**Elección de copia**




**Rotura y unión**




*Figura 5.30*
**Modelos de recombinación.** En la elección de copia, la recombinación se produce durante la síntesis de moléculas hijas de ADN. La replicación del ADN comienza con un molde de ADN parental y después cambia a una segunda molécula parental, dando como resultado la síntesis de ADN recombinantes hijos que contienen secuencias homólogas con ambos progenitores. En la rotura y unión, la recombinación ocurre como resultado de romper y unir cruzadas las dos moléculas parentales de ADN.

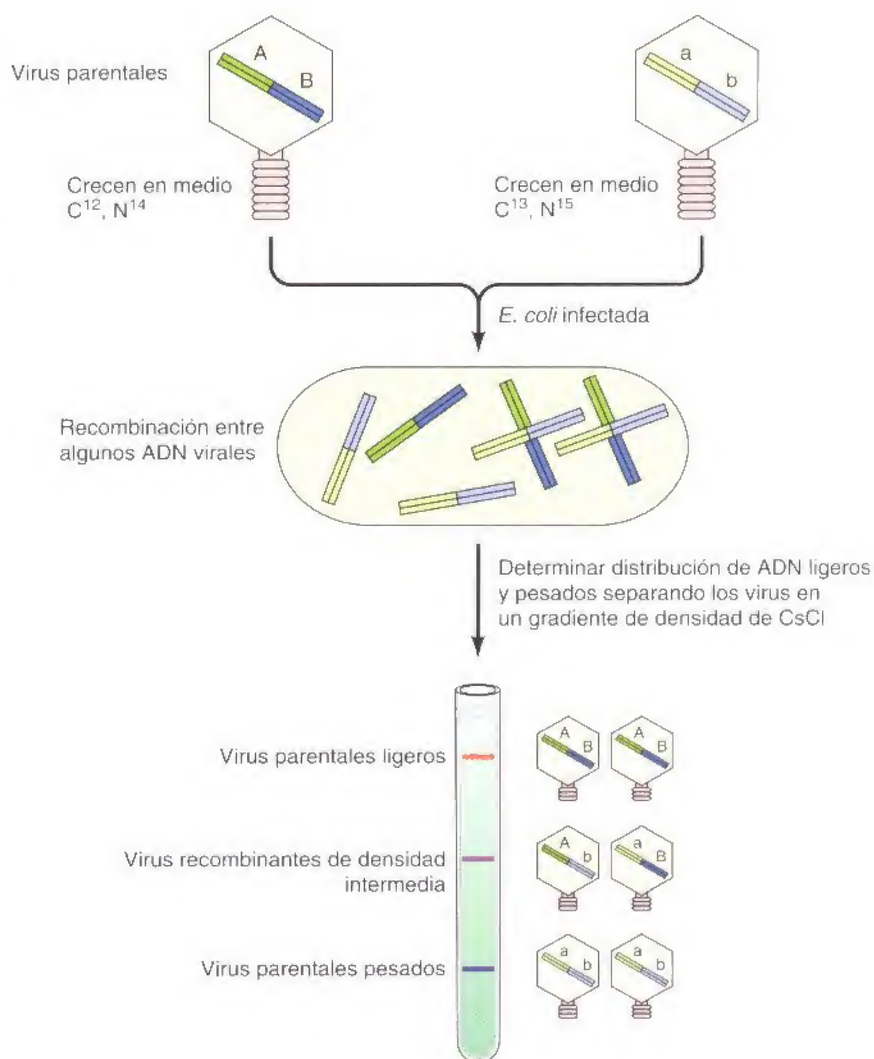



*Figura 5.31*
**Demostración experimental de recombinación por rotura y unión.** Se cultivan virus parentales genéticamente distintos en un medio que contiene isótopos ligeros o pesados de carbono ($C^{12}$ o $C^{13}$) y nitrógeno ($N^{14}$ o $N^{15}$) para marcar la densidad de las moléculas ADN. Se infecta a *E. coli* bajo condiciones que inhiben la replicación, recogiéndose los virus de la progenie y analizándose por centrifugación de equilibrio en un gradiente de CsCl para determinar la densidad de los recombinantes genéticos. Los virus recombinantes mostraron tener densidades intermedias, indicando que habían adquirido ADN de ambos virus parentales mediante un mecanismo de rotura y unión.

raba durante la síntesis de ADN, como resultado de copiar primero una hebra parental de ADN y después cambiar para copiar un molde distinto. La propuesta alternativa fue que la recombinación resultaba de la rotura y la unión de dos moléculas parentales de ADN en lugar de la síntesis de un nuevo ADN.

Estas alternativas se apreciaron por primera vez en 1961 mediante estudios de recombinación entre los genomas de virus bacterianos (Fig. 5.31). La infección de *E. coli* con virus portadores de diferentes marcadores genéticos produjo progenie recombinante. Para determinar si esta recombinación implicaba roturas y uniones de los ADN parentales, uno de los virus parentales se cultivó en un medio que contenía isótopos pesados de carbono ($^{13}C$) y nitrógeno ($^{15}N$), mientras que otro fue cultivado en un medio con los isótopos ligeros normales ($^{12}C$ y $^{14}N$). El resultado fueron virus parentales con densidades diferentes, de manera que pudieron separarse mediante centrifugación de equilibrio en un gradiente de

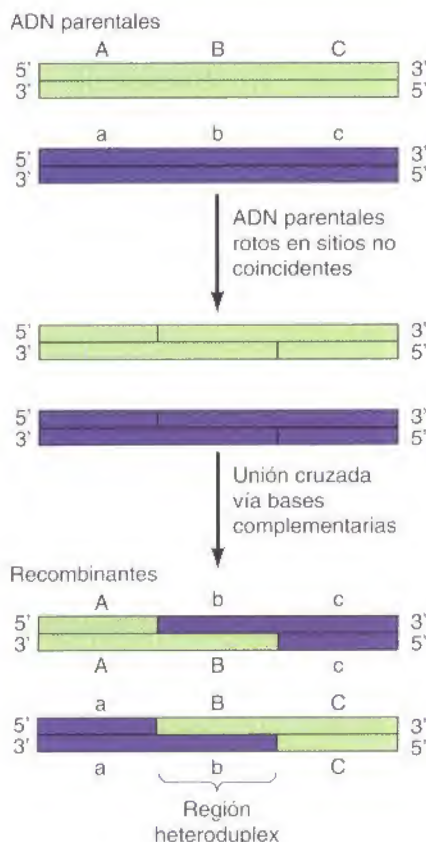



*Figura 5.32*
**Recombinación homóloga mediante complementariedad de bases.** Los ADN parentales se rompen en sitios no coincidentes, intercambiándose las regiones de hebra simple mediante un apareamiento de bases con las secuencias homólogas. El resultado es una región heterodúplex, en la que las dos hebras de ADN se derivan de moléculas parentales diferentes.

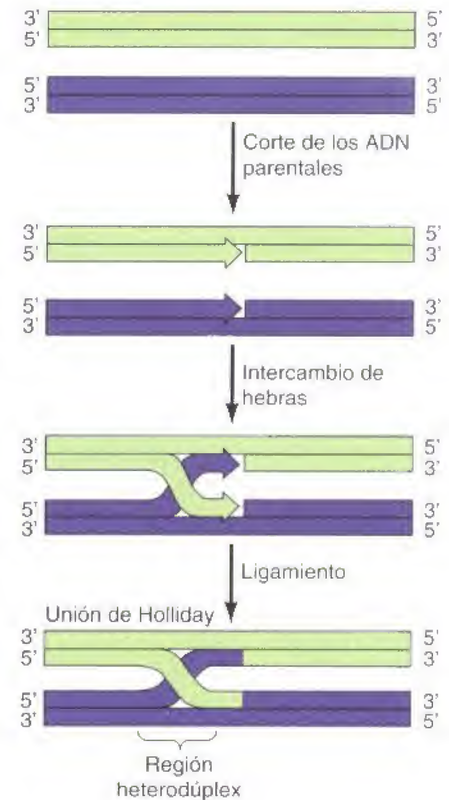



*Figura 5.33*
**Modelo de Holliday para la recombinación homóloga.** Los cortes de hebra simple se introducen en la misma posición en ambas hebras paternas. Las hebras cortadas se intercambian mediante complementariedad de bases, y el ligamiento produce un intermediario de hebras cruzadas denominado unión de Holliday.

densidad de CsCl. Se infectó de nuevo *E. coli* con estos virus parentales marcados de diferente forma bajo condiciones en las que se inhibía la replicación, analizándose la densidad y las características genéticas de la progenie de virus producidos. El resultado más importante fue que los virus genéticamente recombinantes obtenidos presentaban densidades intermedias, indicando que habían adquirido ADN de ambos virus parentales, tal y como o predecía el modelo de rotura-y-unión, y no el de oportunidad de copia.

## Modelos de recombinación homóloga

El descubrimiento de que la recombinación ocurre por rotura y unión planteó una cuestión crítica: ¿cómo pueden romperse dos moléculas parentales de ADN exactamente en el mismo punto, de manera que se puedan unir sin mutaciones resultantes de la ganancia o perdida de nucleótidos en el punto de rotura? Durante la recombinación entre moléculas de ADN homólogas (**recombinación homóloga general**), se proporciona este alineamiento mediante el apareamiento de bases entre las hebras de ADN complementarias (Fig. 5.32). Entre las moléculas de ADN homólogas se intercambian hebras simples que están empalmadas las unas a las otras, conduciendo a la formación de una región heterodúplex, en la que las dos hebras de la doble hélice recombinante se derivan de diferentes moléculas progenitoras. Si la región heterodúplex contiene una diferencia genética, el resultado es una progenie de moléculas de ADN que contiene dos marcadores genéticos. En algunos casos, las bases no emparejadas en un heterodúplex pueden reconocerse y corregirse mediante los sistemas de reparación de emparejamientos, como discutimos en secciones anteriores en este capítulo. La evidencia genética de la formación y reparación de estas regiones heterodúplex, obtenida por los estudios de recombinación en hongos y en bacterias, condujo al desarrollo de un modelo molecular de recombinación en 1964. Este modelo, conocido como el **modelo de Holliday** (por Robin Holliday), continuó proporcionando las bases de la corriente de pensamiento actual sobre los mecanismos de recombinación, aunque se ha ido modificando con la obtención de nuevos datos.

La versión original del modelo de Holliday proponía que la recombinación se iniciaba mediante la introducción de cortes en la misma posición en las dos moléculas parentales (Fig. 5.33). Las hebras de ADN con el corte se desenrollaban parcialmente, invadiendo cada una a la otra molécula por medio de la complementariedad con la hebra sin romper. El ligamiento de las hebras rotas producía un intermediario de hebras cruzadas, conocido como la **unión o intermediario de Holliday**, que es el intermediario central en la recombinación. La demostración directa de la unión de Holliday por microscopía electrónica ha corroborado este modelo de recombinación (Fig. 5.34).

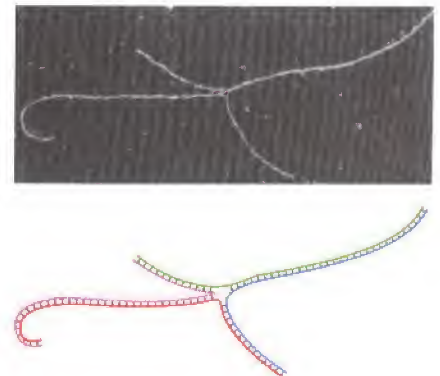


*Figura 5.34*
**Identificación de la unión de Holliday mediante microscopía electrónica.** Micrografía electrónica de una unión o intermediario de Holliday que fue detectada durante la recombinación del ADN de plásmidos en *E. coli*. Debajo se muestra una interpretación dibujada de la estructura. La molécula ilustra una unión de Holliday en configuración abierta como resultado de la rotación del intermediario de hebras cruzadas (véase Fig. 5.33.) (Cortesía de Huntington Potter, University of South Florida, y David Dressler, University of Oxford).

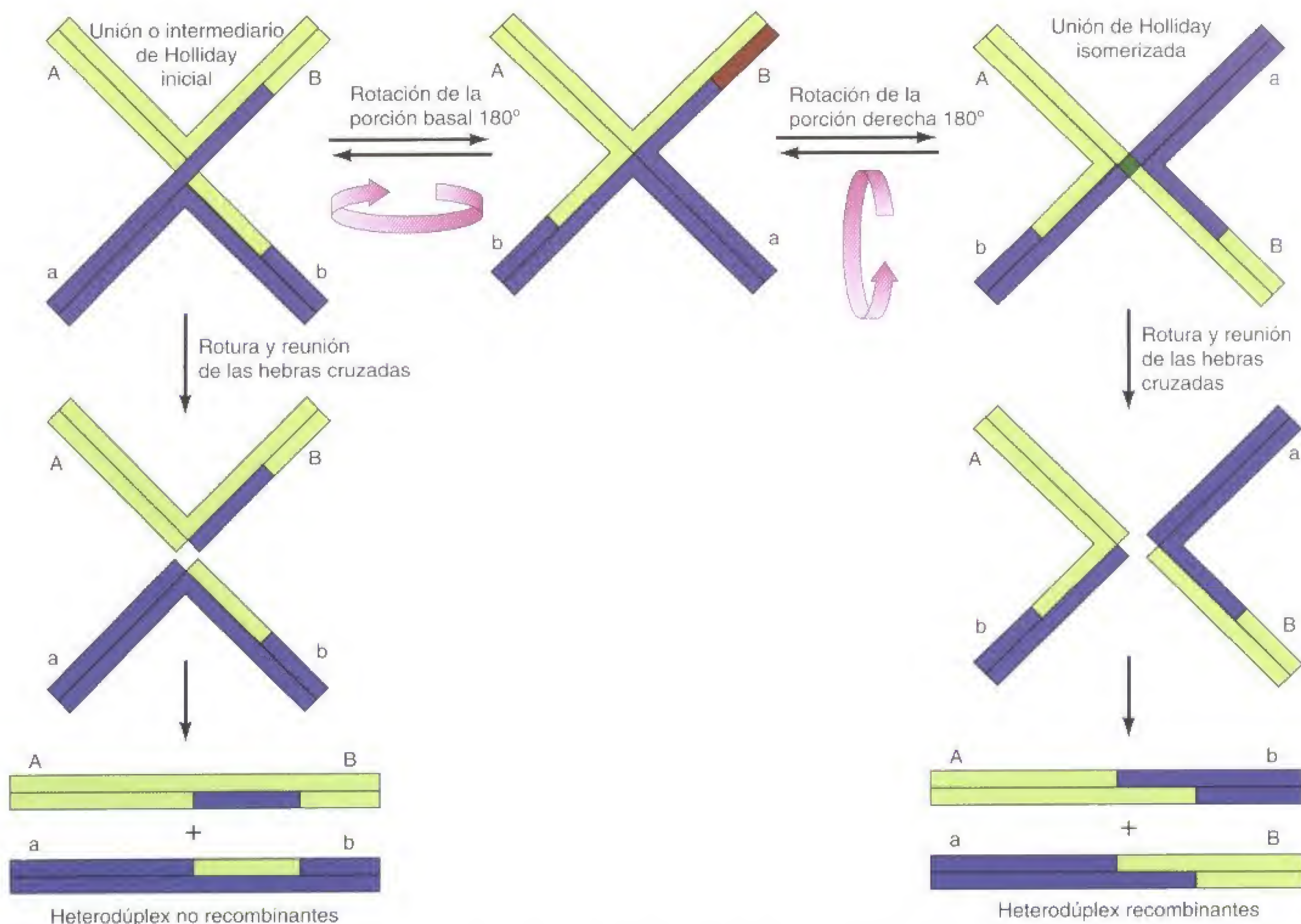



*Figura 5.35*
**Isomerización y resolución de las uniones de Holliday.** Las uniones o intermediarios de Holliday se resuelven cortando y uniendo las hebras cruzadas. Si se resuelve la unión Holliday formada por el intercambio inicial de hebras, la progenie resultante son heterodúplex pero no son recombinantes para los marcadores genéticos fuera de la región heterodúplex. Sin embargo, dos rotaciones de la molécula de hebras cruzadas produce un isómero en el que las hebras parentales que no se rompen se cruzan, en lugar de las hebras inicialmente cortadas. El corte y la unión de las hebras cruzadas de este isómero producen una progenie que es heterodúplex recombinante.

Una vez que el intermediario Holliday se ha formado, se puede resolver cortando y volviendo a unir las hebras cruzadas para producir moléculas recombinantes (Fig. 5.35). Esto puede ocurrir de dos maneras diferentes, dependiendo de la orientación de la unión Holliday, que puede a su vez formar dos isómeros. En el isómero resultante del intercambio de hebras inicial, las hebras cruzadas son aquéllas que se rompieron al inicio del proceso de recombinación. Sin embargo, la simple rotación de esta estructura produce un isómero distinto en el que se cruzan las hebras parentales sin romper. La solución de estos isómeros tiene consecuencias genéticas diferentes. En el primer caso, la progenie de moléculas contiene regiones heterodúplex pero no son recombinantes en el ADN que flanquea esta regiones. Si se da la isomerización, sin embargo, el corte y la unión de las hebras cruzadas dan como resultado una progenie de moléculas que son recombinantes en el ADN que flanquea las regiones heterodúplex. La estructura del intermediario Holliday proporciona por tanto la posibilidad de generar heterodúplex recombinantes y no recombinantes, confirmando los datos genéticos en los que se basaba el modelo de Holliday.

Como se propuso inicialmente, el modelo Holliday no explicaba cómo se iniciaba la recombinación por el corte simultáneo de ambas moléculas parentales en la misma posición. Ahora parece que la recombinación generalmente se inicia en las roturas de doble hebra, tanto durante la reparación del ADN como durante la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis (Fig. 5.36). Ambas hebras de ADN en la rotura de doble hebra son en primer lugar reseccionadas en dirección 5' a 3' por parte de nucleasas que digieren el ADN, dando lugar a extremos libres sencillos. Estas hebras sencillas entonces invaden a la otra molécula parental por apareamiento de bases homólogas. A continuación los huecos son rellenados por la síntesis de reparación y las hebras son unidas por ligación para dar lugar a una molécula con una intersección doble de Holliday, la cual puede resolverse para dar lugar a moléculas heterodúplex recombinantes o no recombinantes, como se ha descrito previamente.

### *Enzimas implicadas en la recombinación homóloga*

La mayoría de las enzimas conocidas por participar en la recombinación se han identificado mediante el análisis de mutantes defectivos en la recombinación de *E. coli*. Estos análisis genéticos han establecido que la recombinación requiere enzimas específicas, además de proteínas (como la ADN polimerasa, ligasa, y proteínas de unión al ADN de hebra simple) que funcionan en diversos aspectos del metabolismo del ADN. La identificación de los genes requeridos en una recombinación eficiente en *E. coli* condujo al aislamiento de sus proteínas codificadas, que han sido caracterizadas bioquimicamente en sistemas libres de células. Estos estudios han permitido descubrir la acción de diversas enzimas en la catalización de la formación y resolución de uniones de Holliday.

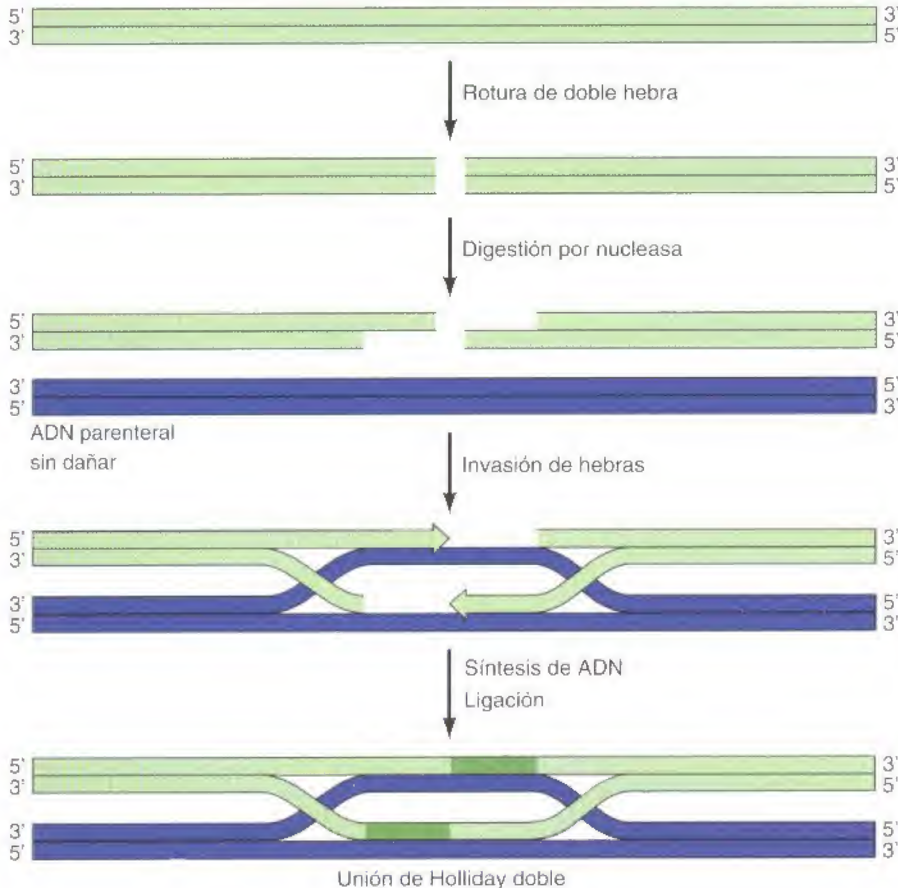



*Figura 5.36*
**Iniciación de la recombinación por roturas de doble hebra.** Ambas hebras de ADN son digeridas por nucleasas en el punto de rotura de doble hebra en la dirección 5′ a 3′. A continuación, las hebras sencillas invaden la otra molécula parental por apareamiento de bases homólogas. Ahora los huecos son rellenados mediante la síntesis de reparación y sellados mediante ligación, dando lugar a una unión de Holliday doble.

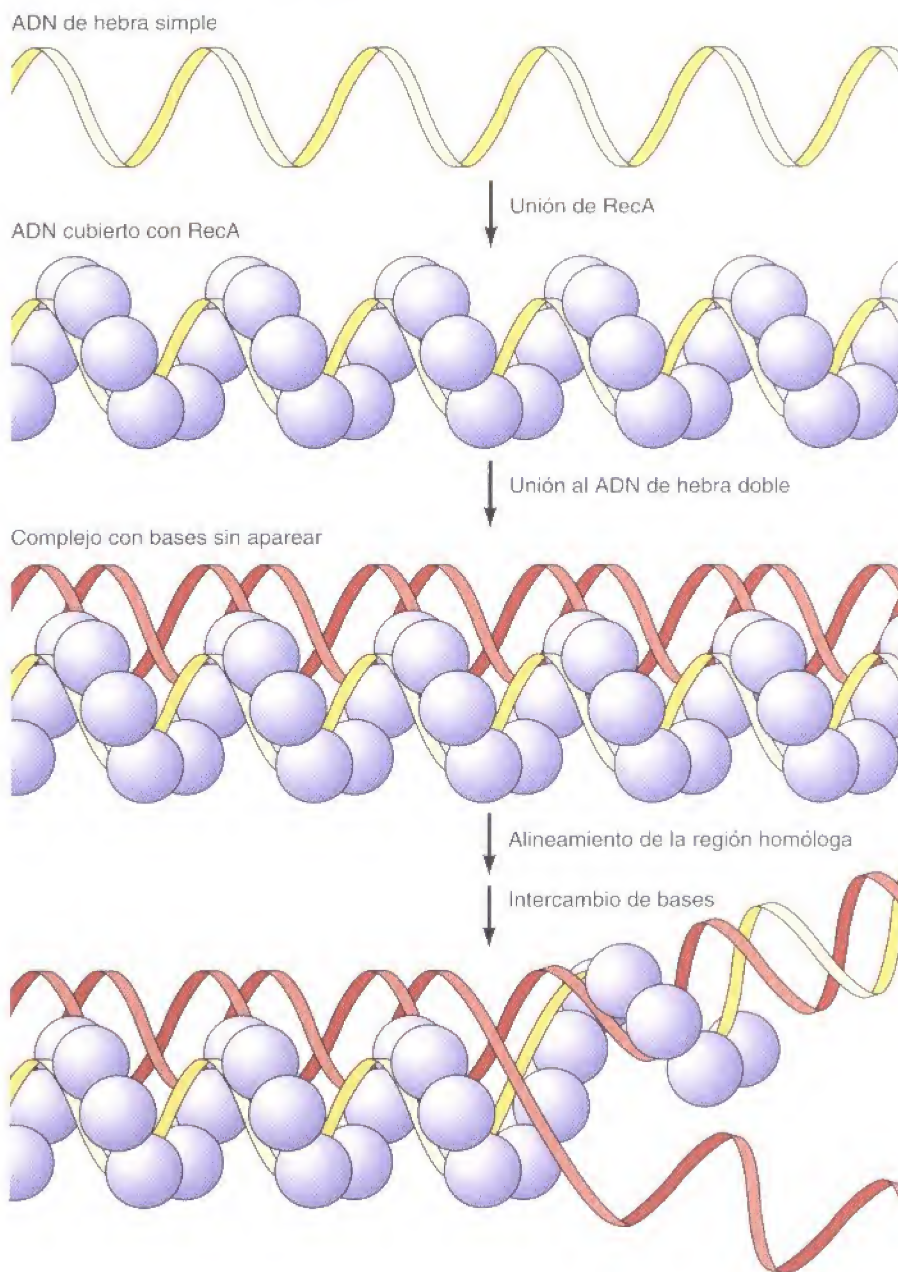



*Figura 5.37*
**Función de la proteína RecA.** RecA se une inicialmente a un ADN de hebra simple para formar un filamento de ADN-proteína. La proteína RecA que envuelve al ADN de hebra simple se une a una segunda molécula de ADN de doble hebra para formar un complejo sin apareamiento de bases. Seguidamente se produce la complementariedad de bases y el intercambio de hebras, formando una región heterodúplex.

La proteína central implicada en la recombinación homóloga es **RecA**, que promueve el intercambio de hebras entre las moléculas de ADN homólogas que causa la formación de los heterodúplex (Fig. 5.37). La acción de RecA puede dividirse en tres etapas. En la primera, la proteína RecA se une al ADN de hebra simple, envolviendo al ADN para formar un filamento de proteína-ADN. Debido a que RecA contiene dos sitios de unión al ADN, la proteína RecA que está unida a la hebra simple de ADN es capaz de unirse a una segunda molécula de ADN de hebra doble, para formar un complejo entre las dos moléculas de ADN. La asociación no específica mediada por RecA continua con el apareamiento específico de bases entre el ADN de hebra simple y su complementario. La proteína RecA cataliza después el intercambio de hebras, con la hebra simple originalmente envuelta por RecA desplazando su hebra homóloga para formar un heterodúplex. Por tanto, la proteína RecA es capaz de catalizar, por sí misma, las reacciones del intercambio de hebras que es esencial para la formación de los intermediarios de Holliday.

En las levaduras, una proteína relacionada con RecA, llamada RAD51, es necesaria tanto para la recombinación genética como para la reparación de las roturas de hebra doble. RAD51 no solo es estructuralmente similar a RecA; como RecA, también es capaz de catalizar las reacciones de intercambio de hebras *in vitro*. Las proteínas relacionadas con RAD51 han sido identificadas en eucariotas complejos, incluyendo a los humanos, indicando que las proteínas relacionadas con RecA desempeñan papeles claves en la recombinación homóloga de las células procariotas y eucariotas.

Una vez que se ha formado una intersección de Holliday, un complejo de otras tres proteínas de *E. coli* (Ruv A, B y C) se implican en la recombinación (Fig. 5.38). Ruv A reconoce a la intersección de Holliday y recluta a Ruv B, que actúa como un motor que dirige la migración del punto en el que se cruzan las hebras de ADN, variando así la extensión de la región del heterodúplex y la posición en la que las hebras cruzadas serán cortas y estar´an reunidas. Ruv C ahora resuelve las intersecciones de Holliday cortando las hebras de ADN cruzadas. La reunión de las hebras cortadas mediante ligación completa el proceso, dando lugar a dos moléculas recombinantes. Las células eucarióticas no poseen homólogos de las proteínas Ruv A, B y C de *E. coli*. Por el contrario, la resolución de las intersecciones de Holliday en células eucariotas parece estar mediada por otras proteínas, que siguen sin estar totalmente caracterizadas.

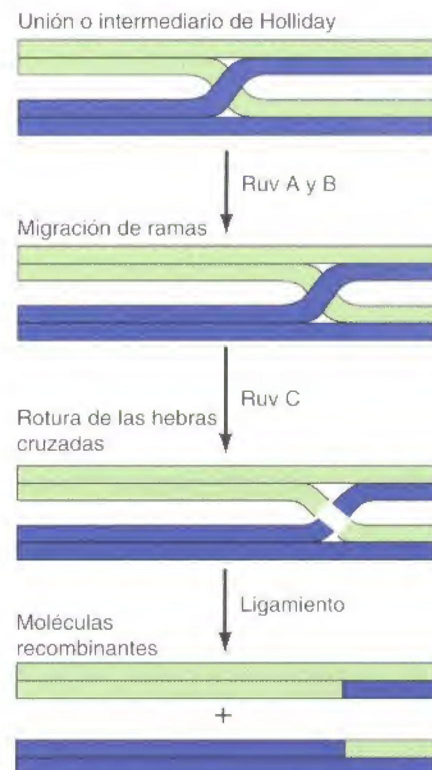



*Figura 5.38*
**Migración de ramas y resolución de las uniones o intermediarios de Holliday.** Dos proteínas de *E. coli* (RuvA y RuvB) catalizan el movimiento del punto donde las hebras se cruzan en las uniones de Holliday (migración de ramas). RuvC resuelve las uniones de Holliday rompiendo las hebras cruzadas, que son unidas por una ligasa.

## Reorganización del ADN

La recombinación homóloga da lugar a la reorganización de genes entre pares de cromosomas sin alterar la disposición de los genes en el genoma. Por el contrario, otros procesos recombinatorios conducen a la reorganización del ADN genómico. Algunas de estas organizaciones del ADN son importantes para el control de la expresión génica en determinados tipos de células; otros pueden desempeñar un papel evolutivo al contribuir con la diversidad genética.

El descubrimiento de que los genes son capaces de moverse a diferentes localizaciones surgió a raíz de los estudios de Barbara McClintock con maíz en los años cuarenta. Basada estrictamente en análisis genéticos, McClintock describió nuevos elementos genéticos que podían moverse a distintas localizaciones en el genoma y que alteraban la expresión de los genes adyacentes. Sin embargo tuvieron que pasar cerca de tres décadas después del descubrimiento de McClintock hasta que la mayoría de los científicos aceptaran el descubrimiento de elementos transposables en bacterias y la noción de elementos genéticos móviles. Actualmente se reconocen diversos tipos de reorganizaciones del ADN, incluyendo la transposición de los elementos inicialmente descrita por McClintock, en las células procariotas y eucariotas. Es más, en la actualidad se sabe que los elementos transponibles constituyen una gran fracción de los genomas de animales y plantas, incluyendo casi la mitad del genoma humano.

### *Recombinación específica de sitio*

Contraria a la recombinación homóloga, que ocurre en cualquier región de secuencia homóloga, la **recombinación específica de sitio** se da entre secuencias específicas de ADN, que normalmente son homólogas en tan solo una franja estrecha de ADN. La interacción principal en este proceso está mediada por proteínas que reconocen las secuencias específicas diana del ADN en lugar de la complementariedad de bases.

El prototipo de la recombinación específica de sitio se ha obtenido de los estudios del bacteriófago $\lambda$. Cuando $\lambda$ infecta a *E. coli*, bien se replica para causar la lisis celular o puede integrarse en el cromosoma bacteriano, formando un profago que se mantiene como parte del genoma de *E. coli* (proceso denominado **lisogenia**) (Fig. 5.39). Bajo las condiciones apropiadas, la integración del ADN se puede invertir, provocando la escisión del ADN del fago $\lambda$ y la iniciación

de la replicación viral lítica. Tanto la integración como la escisión del ADN de λ implican la recombinación específica de sitio entre las secuencias del ADN viral y la célula huésped.

El ADN de *E. coli* y el ADN del λ se recombinan en sitios específicos, llamados sitios de adhesión (*att*; del inglés *attachment sites*). Por tanto, la integración del ADN de λ implica la recombinación entre los sitios *att* del fago (*attP*) y de la bacteria (*attB*), que presentan 240 y 25 nucleótidos, respectivamente (Fig. 5.40). El proceso está mediado por una proteína de λ llamada integrasa (Int), que se une específicamente a las secuencias *attP* y *attB*. Int inicialmente se une a *attP*, formando un complejo en el que el ADN *attP* está envuelto por múltiples

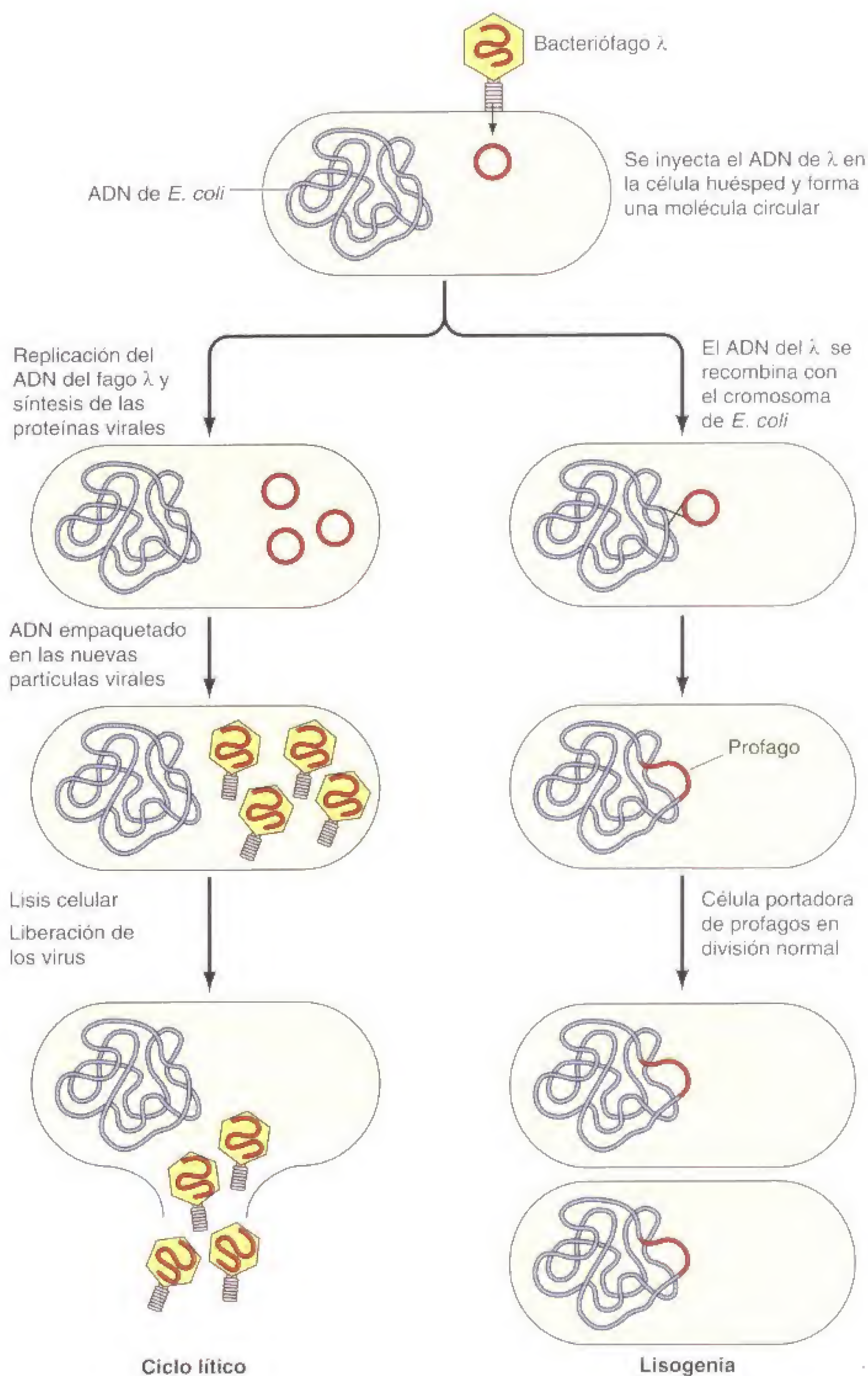



*Figura 5.39*
**Procesos lítico y lisogénico del bacteriófago λ.** La infección de *E. coli* se inicia con la inyección del ADN del λ, que pasa a ser circular una vez dentro de la célula huésped. En la infección lítica, el ADN de λ se replica y dirige la síntesis de proteínas virales. El ADN viral se empaqueta en los virus de la progenie, que son liberados después de la lisis de la célula. En la infección lisogénica, el ADN de λ se recombina con el genoma del huésped para formar un profago que se integra en el cromosoma de *E. coli*. El ADN de λ integrado no dirige la síntesis de virus, sino que se replica junto con el genoma de la bacteria.

copias de la proteína Int. El complejo Int-*attP* se une a *attB*, alineando los sitios *att* del fago y de la bacteria. El fago y la bacteria intercambian hebras dentro de una secuencia central de 15 nucleótidos compartidos por *attP* y *attB* (Fig. 5.40). La proteína Int introduce cortes en el interior de la región central homóloga a *attB* y *attP*, cataliza el intercambio de hebras, y liga las hebras rotas, integrando al ADN de $\lambda$ en el cromosoma de *E. coli*. La proteína Int también actúa en la escisión del profago $\lambda$, que esencialmente es la inversión del proceso de integración.

La recombinación específica de sitio es importante no solo en la interacción entre virus como $\lambda$ y sus células huésped, sino también en las reorganizaciones programadas dentro de los genomas celulares. En los vertebrados, la recombi-

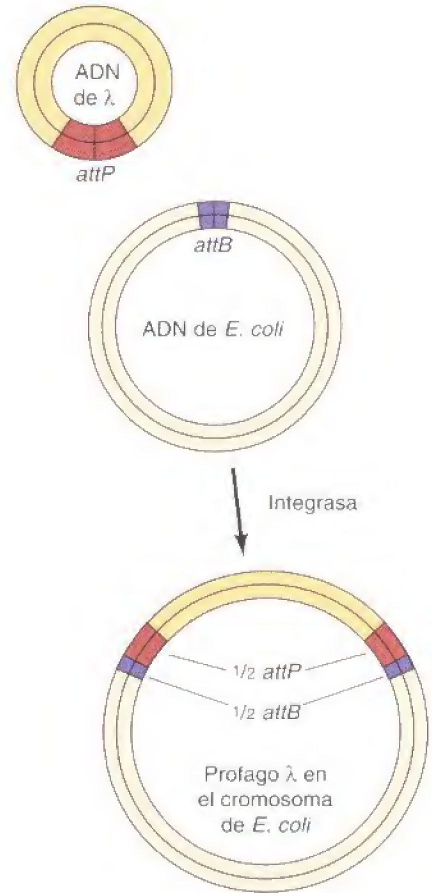



*Figura 5.40*
**Integración del ADN de $\lambda$ mediante recombinación específica de sitio.** La integración resulta de la recombinación entre secuencias específicas en los genomas de $\lambda$ y *E. coli*, llamados *attP* y *attB*, respectivamente. El proceso está catalizado por una enzima codificada por el virus (integrasa), que reconoce las secuencias *attP* y *attB*.

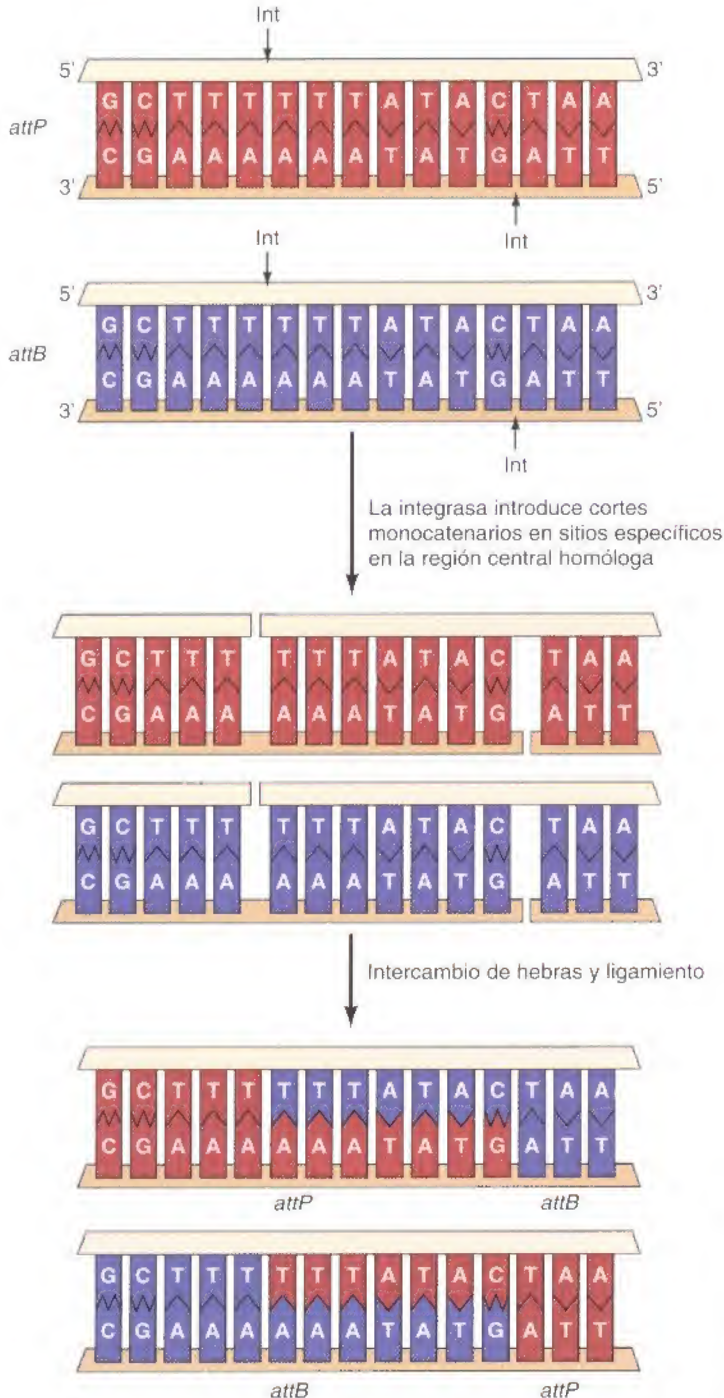



*Figura 5.41*
**Mecanismo de recombinación específica de $\lambda$.** La recombinación específica de sitio ocurre en una secuencia con un centro de 15 nucleótidos homólogos compartidos por *attP* y *attB*. La integrasa (Int) rompe en sitios específicos de esta secuencia para generar colas de ADN de hebra simple. Después cataliza el intercambio de hebras y su ligamiento, dando como resultado la recombinación entre *attP* y *attB* y la integración del ADN de $\lambda$.

nación de específica de sitio resulta crítica para el desarrollo del sistema inmune, que reconoce sustancias ajenas (**antígenos**) y proporciona protección frente a agentes infecciosos. Existen dos clases principales de respuestas inmunes, las cuales están mediadas por linfocitos B y T. Los linfocitos B producen anticuerpos (**inmunoglobulinas**) que reaccionan con antígenos solubles; los linfocitos T expresan proteínas de superficie celular (llamados **receptores de células T**) que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de otras células. La característica principal de las inmunoglobulinas y los receptores de células T es su enorme diversidad, que permite a diferentes moléculas de anticuerpos y receptores de las células T reconocer a un vasto número de antígenos ajenos. Por ejemplo, cada individuo es capaz de producir más de $10^{11}$ moléculas diferentes de anticuerpos, lo que es en exceso superior al número total de genes en el genoma humano (30.000-40.000). En lugar de estar codificados en la línea germinal del ADN, estos anticuerpos tan diversos (y los receptores de las células T) están codificados por genes únicos de linfocitos que se forman durante el desarrollo del sistema inmune como resultado de la recombinación específica de sitio entre los distintos segmentos de los genes de las inmunoglobulinas y los receptores celulares T.

El papel de la recombinación de sitio específico en la formación de los genes de las inmunoglobulinas lo demostró por primera vez Susumu Tonegawa en 1976. Las inmunoglobulinas consisten en pares de cadenas de nucleótidos pesadas y ligeras idénticas (Fig. 5.42). Las cadenas pesadas y ligeras se componen de regiones C-terminal constantes y regiones N-terminal variables. Las regiones variables, que contienen diferentes secuencias de aminoácidos en diferentes moléculas de inmunoglobulinas, son las responsables de la unión con el antígeno, y es la diversidad de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables las que permiten a los anticuerpos de un individuo reconocer a antígenos únicos. Aunque cada individuo es capaz de producir un vasto espectro de anticuerpos distintos, cada linfocito B produce un solo tipo de anticuerpo. El descubrimiento clave de Tonegawa fue que cada anticuerpo esta codificado por genes únicos formados por recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos B. Estas reorganizaciones genéticas crean diferentes genes de inmunoglobulinas en los diferentes linfocitos B del individuo, de manera que la población aproximada de $10^{12}$ linfocitos B en el cuerpo humano incluye células capaces de producir anticuerpos en contra de una gran diversidad de antígenos.

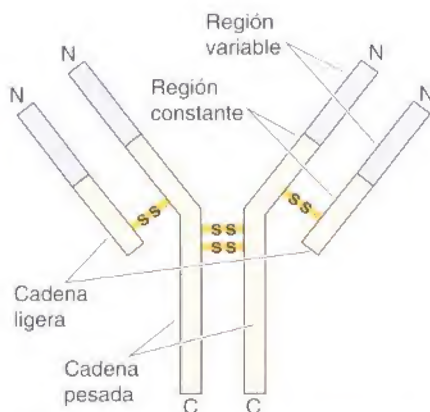



*Figura 5.42*
**Estructura de una inmunoglobulina.** Las inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras presentan regiones variables y constantes.

Los genes que codifican las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas constan de tres regiones: una región V que codifica entre 95 y 96 aminoácidos N-terminales de la región polipeptídica variable; una región de unión (J) que codifica entre 12 y 14 aminoácidos C-terminales de la región polipeptídica variable; y una región C que codifica a la región polipeptídica constante (Fig. 5.43). La clase principal de genes que codifican la cadena ligera en el ratón se forman por la combinación de aproximadamente 250 regiones V y cuatro regiones J con una sola región C. La recombinación específica de sitio durante el desarrollo de los linfocitos conduce a la reorganización del gen en la que una sola región V se recombina con una sola región J para generar un gen de cadena ligera funcional. Diferentes regiones V y J se reorganizan en diferentes linfocitos B, de modo que las combinaciones posibles de 250 regiones V con 4 regiones J pueden generar aproximadamente 1.000 (4 × 250) cadenas ligeras únicas.

Los genes de las cadenas pesadas incluyen una cuarta región (conocida como la de diversidad, o región D), que codifica los aminoácidos situados entre las regiones V y J (Fig. 5.44). El ensamblaje del gen funcional de la cadena pesada requiere dos procesos de recombinación: Una región D se recombina con una región J, y después una región V se recombina con el segmento recombinado DJ. En el ratón, existen alrededor de 500 regiones V de cadena pesada, 12 regiones D, y 4 regiones J, por lo que el número total de cadenas pesadas que se pueden generar mediante los procesos de recombinación es 24.000 (500 × 12 × 4).

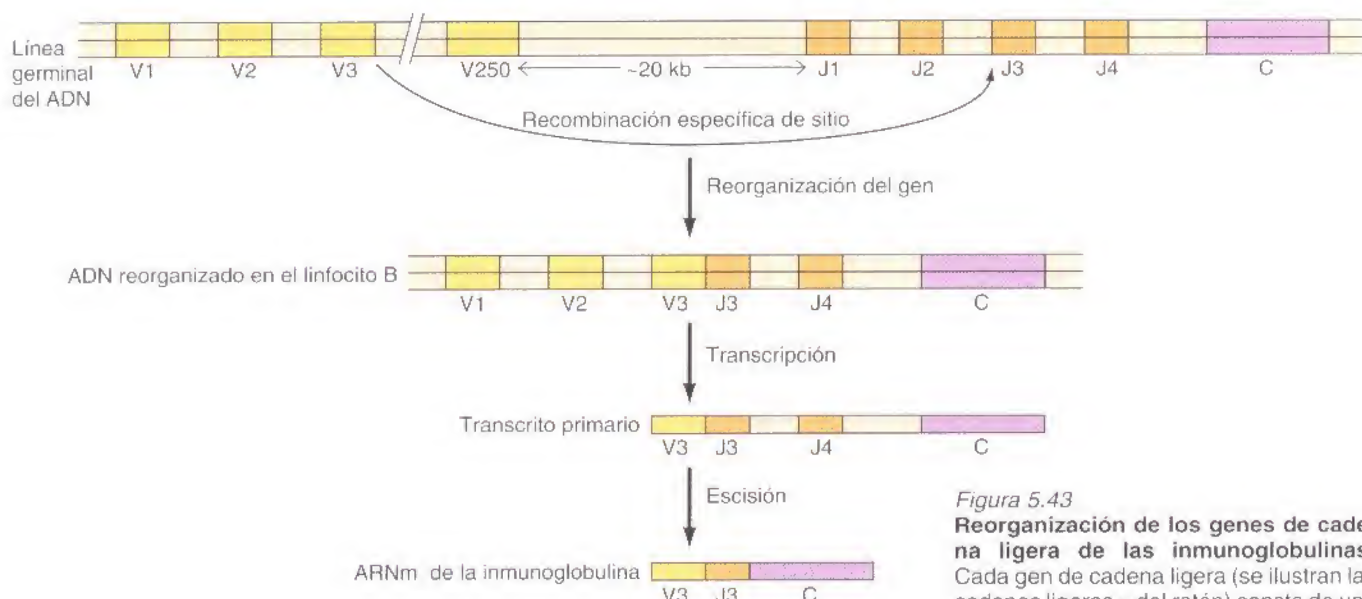



*Figura 5.43*
**Reorganización de los genes de cadena ligera de las inmunoglobulinas.** Cada gen de cadena ligera (se ilustran las cadenas ligeras $\kappa$ del ratón) consta de una región constante (C), una región de unión (J) y de una región variable (V). Existen aproximadamente 250 regiones V diferentes, que están separadas de J y C por unas 20 kb en la línea germinal del ADN. Durante el desarrollo de los linfocitos B, la recombinación específica de sitio une una de las regiones V a una de las cuatro regiones J. Esta reorganización activa la transcripción, resultando la formación de un transcrito primario que contiene la región organizada VJ junto con las regiones J y C restantes. Las regiones J no utilizadas y los intrones entre J y C se eliminan por escisión, produciendo un ARNm funcional.

Las combinaciones entre las 1.000 cadenas ligeras diferentes y las 24.000 cadenas pesadas diferentes que se han formado por recombinación específica de sitio pueden generar aproximadamente $2 \times 10^7$ moléculas de inmunoglobulina diferentes. Esta diversidad aumenta aún más debido a que las uniones entre los segmentos genéticos de las inmunoglobulinas son con frecuencia imprecisas, perdiéndose desde uno hasta varios nucleótidos o ganándose otros en los sitios de unión. Las mutaciones que resultan de estas deleciones e inserciones incrementan la diversidad de las regiones variables de las inmunoglobulinas aproximadamente unas 100 veces más, correspondiendo con la formación de unas $10^5$ cadenas ligeras diferentes y $2 \times 10^6$ cadenas pesadas, que pueden combinarse después para formar más de $10^{11}$ anticuerpos distintos. Aún así, des-

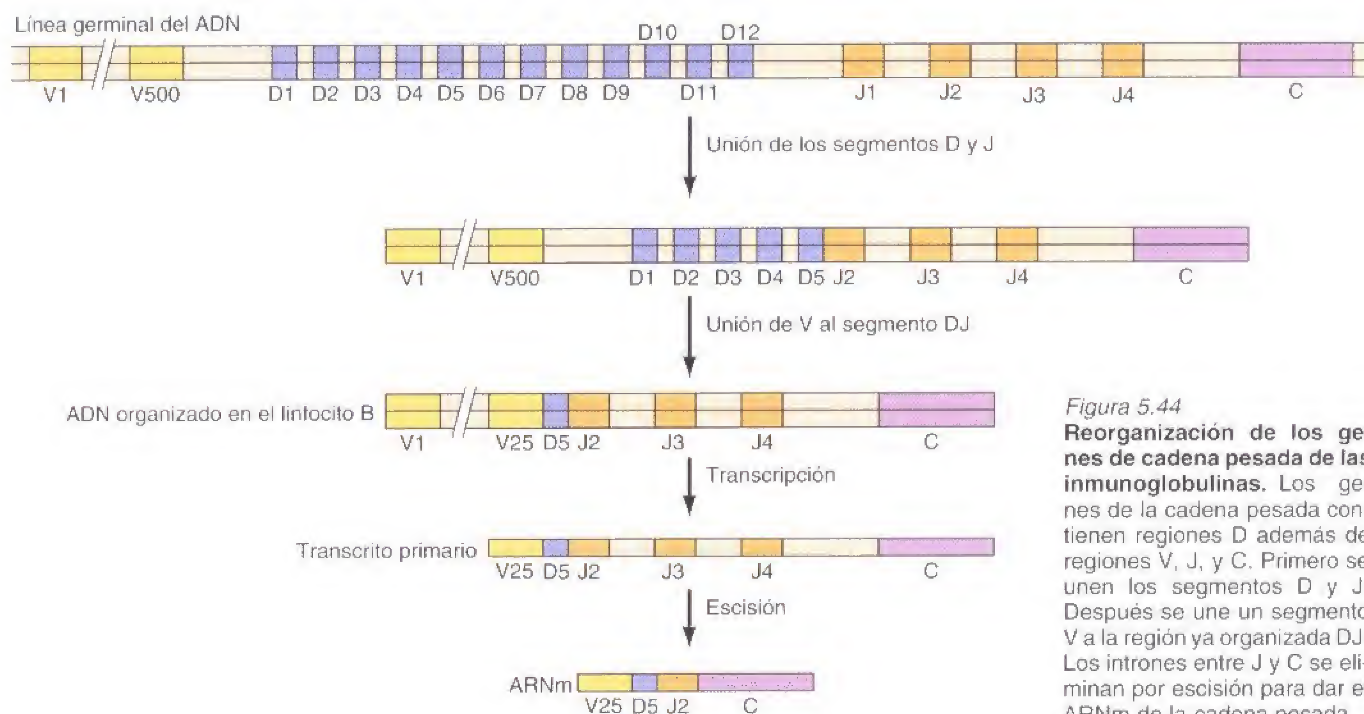



*Figura 5.44*
**Reorganización de los genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas.** Los genes de la cadena pesada contienen regiones D además de regiones V, J, y C. Primero se unen los segmentos D y J. Después se une un segmento V a la región ya organizada DJ. Los intrones entre J y C se eliminan por escisión para dar el ARNm de la cadena pesada.

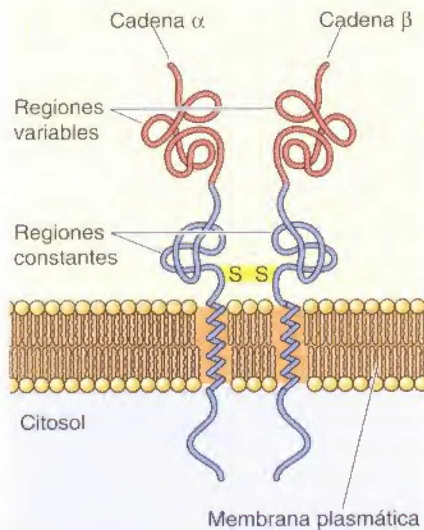



*Figura 5.45*
**Estructura de un receptor de células T.** Los receptores de células T se componen de dos cadenas polipeptídicas ($\alpha$ y $\beta$) que atraviesan la membrana plasmática y que están unidas por puentes disulfuro. Las cadenas $\alpha$ y $\beta$ se componen de regiones variables y constantes.

pués de la formación de los genes recombinantes de inmunoglobulinas se sigue generando mayor diversidad de anticuerpos a través del proceso conocido como hipermutación somática, que consiste en la introducción de mutaciones frecuentes en las regiones variables en los genes de las cadenas pesadas y ligeras.

Los receptores de las células T de forma similar se componen de dos cadenas (llamadas $\alpha$ y $\beta$), cada una de ellas presentando regiones variables y constantes (Fig. 5.45). Los genes que codifican estos polipéptidos se generan por la recombinación entre los segmentos V y J (la cadena $\alpha$) o entre los segmentos V, D, y J (la cadena $\beta$), análogamente a la formación de los genes de las inmunoglobulinas. La recombinación específica de sitio entre los distintos segmentos de ADN, en combinación con las mutaciones introducidas durante la recombinación, genera un grado de diversidad de los receptores de células T similar al de las inmunoglobulinas. Sin embargo, los receptores de células T difieren de las inmunoglobulinas en que ellas no aumentan su diversidad por hipermutación somática.

La recombinación VDJ está mediada por un complejo de dos proteínas, denominadas RAG1 y RAG2, que se expresan específicamente en linfocitos. Las proteínas RAG reconocen las secuencias señal de recombinación (RS) adyacentes a las secuencias codificadoras de cada segmento, génico, e inician las reorganizaciones de ADN introduciendo una rotura de doble hebra entre las secuencias RS y las secuencias codificantes (Fig. 5.46). A continuación, se unen los extremos codificantes de los segmentos génicos para dar lugar a un gen reorganizado de inmunoglobulina o receptor de células T. Resulta interesante que RAG1 está íntimamente relacionada con las enzimas que catalizan la transposición e integración de ADN retroviral, como discutiremos en la siguiente sección de este capítulo.

## *Transposición vía intermediarios de ADN*

La recombinación específica de sitio ocurre entre dos secuencias específicas que contienen al menos un pequeño centro homólogo. Por el contrario, la **transposición** implica el movimiento de secuencias a través del genoma y no requiere secuencias homólogas. Los elementos que se mueven por transposición, como aquellos que describió por primera vez McClintock, se denominan **elementos transponibles**, o **transposones**. Se dividen en dos clases generales, dependiendo de si se transponen mediante un intermediario de ADN o por un intermediario de ARN. La primera clase de elementos transponibles se discute aquí; la transposición a través de intermediarios de ARN se considera en la próxima sección.

Los transposones mejor conocidos hasta ahora son los de las bacterias, moviéndose todos ellos por medio de intermediarios de ADN (Fig. 5.47). Los elementos más simples son las secuencias de inserción, con una variedad de tamaño entre los 800 y los 2.000 nucleótidos. Las secuencias de inserción se componen solamente del gen de la enzima que participa en la transposición (transposasa) flanqueada por repeticiones invertidas cortas, que son los sitios donde actúa la transposasa. Los transposones complejos se componen de dos secuencias de inserción que flanquean a otros genes, que se mueven como una unidad.

Las secuencias de inserción se mueven desde un sitio cromosómico hasta otro sin replicar su ADN (Fig. 5.48). La transposasa introduce una rotura simple en el ADN diana y corta en los extremos de las secuencias invertidas repetidas del transposon. Aunque la transposasa actúa específicamente en las repeticiones invertidas del transposon, normalmente es menos específica respecto a la secuencia del ADN diana, de manera que cataliza el movimiento del transposón

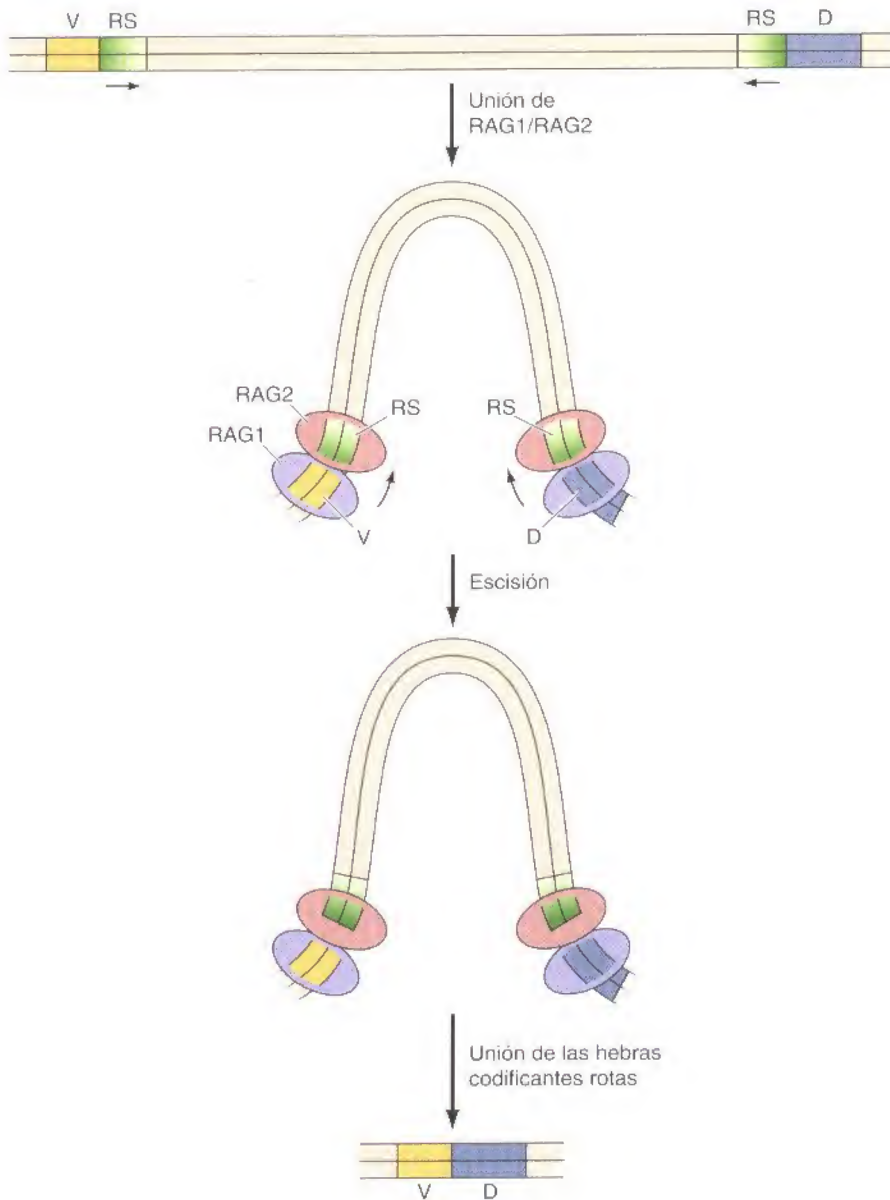



*Figura 5.46*
**Recombinación VDJ.** Los segmentos codificadores de los genes de las inmunoglobulinas y los receptores de células T (p. ej., un segmento V y D) están flanqueados por secuencias de señal de recombinación cortas (RS), opuestamente orientadas en los extremos 5' y 3' de las secuencias codificadoras. Las RS son reconocidas por un complejo de proteínas de recombinación específica de linfocitos RAG1 y RAG2, que rompen el ADN entre las secuencias codificadoras y las RS. Las hebras codificadoras rotas se unen para producir un segmento del gen reorganizado.

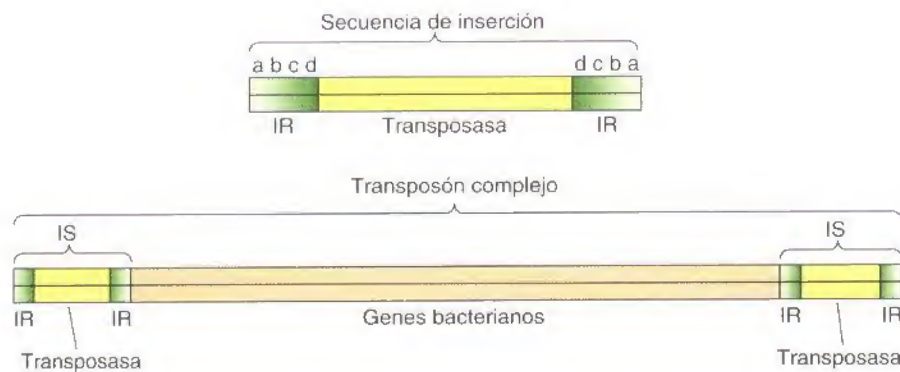
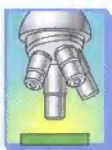



*Figura 5.47*
**Transposones bacterianos.** Las secuencias de inserción varían de 800 a 2.000 nucleótidos y contienen un gen para la transposasa flanqueado por repeticiones invertidas (IR) de unos 20 nucleótidos. Los transposones complejos se componen de dos secuencias de inserción que flanquean a otros genes y tienen una longitud característica de 5 a 20 kb.



Experimento clave

## Reorganización de los genes de inmunoglobulinas

**Evidencia de la reorganización somática de genes de inmunoglobulina que codifican las regiones variable y constante**

Nobumichi Hozumi y Susumu Tonegawa

Instituto de Inmunología de Basel, Basel, Suecia

*Procedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 73, 1976, págs. 3628-3632*

### Contexto

La capacidad del sistema inmune de los vertebrados para reconocer a una variedad infinita de moléculas extrañas implica que los linfocitos son capaces de producir la correspondiente vasta diversidad de anticuerpos. Ya que esta diversidad de anticuerpos es la clave del reconocimiento inmune, comprender el mecanismo mediante el cual aparentemente se codifica un número ilimitado de diferentes inmunoglobulinas en el ADN genómico es uno de los principales temas que trata la inmunología.

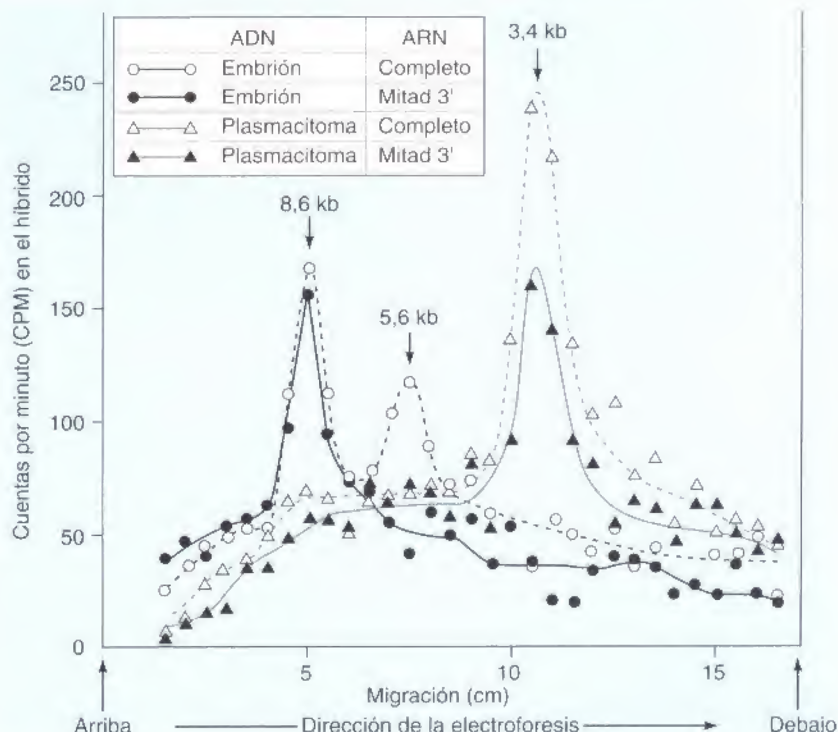
Previamente a los experimentos de Hozumi y Tonegawa, la secuenciación de proteínas de varias inmunoglobulinas había demostrado que las cadenas ligeras y pesadas se componían de distintas regiones variables y constantes. Estudios genéticos posteriores indicaron que los ratones solo heredaban copias simples de los genes de la región constante. Estas observaciones condujeron a proponer que las inmunoglobulinas están codificadas por múltiples genes de regiones variables que pueden asociarse con un gen de región constante. El descubrimiento de las reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas por Hozumi y Tonegawa proporcionó la primera base experimental para esta hipótesis y supuso el inicio del entendimiento de la base molecular de la diversidad de anticuerpos.

### Experimentos

Hozumi y Tonegawa probaron la posibilidad de que los genes que codifican las regiones variable y constante de las inmunoglobulinas estuvieran unidos a nivel del ADN durante el desarrollo de los linfocitos. Se aproximaron experimentalmente utilizando la digestión por endonucleasas de restricción para comparar la organización de las secuencias de las regiones variable y constante en ADN extraídos de embriones de ratón y de células de un plasmocitoma de ratón (un tumor de linfocitos B que produce una sola especie de inmunoglobulinas).

Los ADN del embrión y el plasmocitoma fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, separándose los fragmentos de diferentes tamaños por electroforesis en gel de agarosa. El gel se cortó en láminas, y el ADN extraído de cada lámina fue hibridado con sondas marcadas radiactivamente preparadas a partir de ARNm de inmunoglobulinas aisladas de las células del plasmocitoma. Se utilizaron dos sondas, correspondientes al ARNm completo de la inmunoglobulina o al extremo 3′ del ARNm, compuesto exclusivamente de secuencias con regiones constantes.

El resultado fundamental fue la obtención de patrones completamente distintos para las secuencias de las regiones variables y las regiones constantes detectadas en el ADN del embrión en comparación con los encontrados en el ADN del plasmocitoma (véase figura). En el ADN del embrión, la sonda completa hibrida con dos fragmentos *Bam*HI de unas 8,6 y 5,6 kb, respectivamente.




Gel de electroforesis de los ADNs de embrión y plasmocitoma digeridos con *BamHI* e hibridados con sondas correspondientes al ARNm completo o a la parte 3′ del ARNm del plasmocitoma. Los datos están representados tal y como se detectó la radioactividad en las moléculas híbridas con ADN en cada porción de gel.

### Reorganización de los genes de inmunoglobulinas *(continuación)*

Solamente el fragmento de 8,6 kb hibrida con la sonda 3′, sugiriendo que el fragmento de 8,6 kb contiene las secuencias de la región constante y que el fragmento de 5,6 kb contiene las secuencias de la región variable. Por el contrario, ambas sondas hibridan con un solo fragmento de 3,4 kb en el ADN del plasmocitoma. La interpretación de estos resultados fue que las secuencias de la región variable y constante estaban separadas en el ADN del embrión pero que se reorganizaron para formar un solo gen de inmunoglobulina durante el desarrollo del linfocito.

#### Impacto

Los resultados iniciales de Hozumi y Tonegawa, basados en los datos relativamente indirectos del mapeo con la endonucleasa de restricción, se confirmaron y ampliaron a través de la clonación y secuenciación molecular de los genes de inmunoglobulinas. Estos estudios establecieron que estos genes se generan por recombinación específica de sitio entre distintos segmentos de ADN en los linfocitos B. En los linfocitos T, reorganizamientos similares del ADN son los responsables de la formación de los genes codificadores de los receptores de células T. Por tanto, la recombinación las reorganizacones genéticas programadas son esenciales para el desarrollo del sistema inmune.

Estudios posteriores han demostrado que las regiones variables de las inmunoglobulinas y los receptores de células T se generan mediante reorganizaciones de dos o tres segmentos diferentes de ADN. La habilidad de estos segmentos para recombinarse, junto a una frecuencia elevada de mutaciones



Susumu Tonegawa

introducidas en los sitios de recombinación, es la responsable de la diversidad de las inmunoglobulinas y los receptores de células T. El descubrimiento de los reorganizaciones genéticas de las inmunoglobulinas proporcionó las bases para llegar a entender como el sistema inmune puede reconocer y responder a una variedad virtualmente ilimitada de sustancias ajenas.

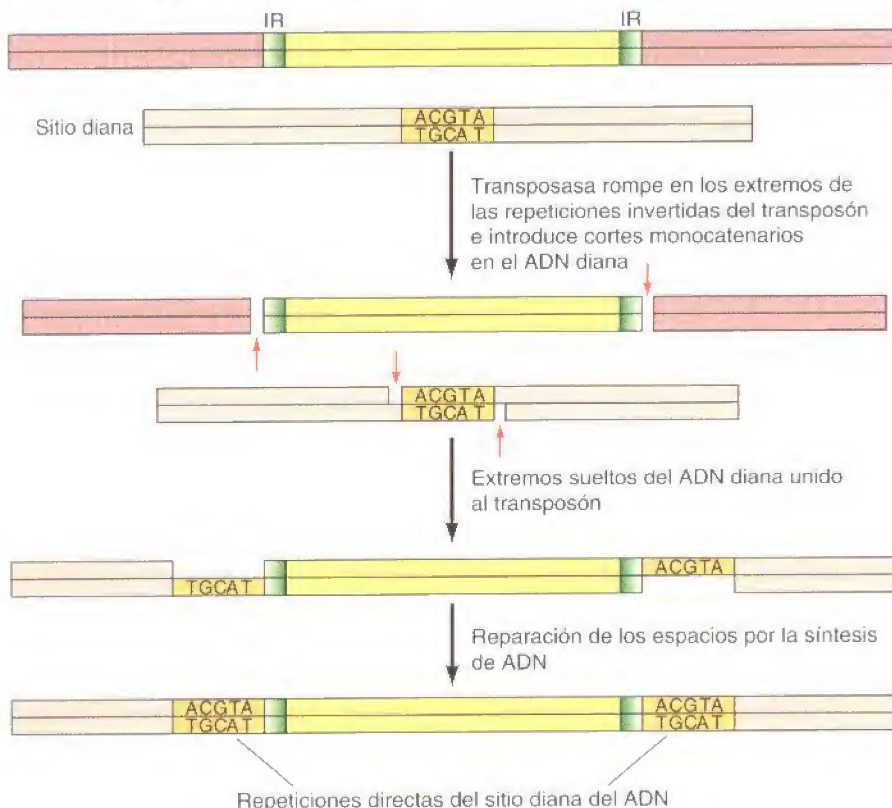



*Figura 5.48*
**Transposición de secuencias de inserción.** La transposición simple no implica la replicación del ADN del transposón. La transposasa rompe en ambos extremos del transposón e introduce un corte monocatenario en el ADN diana. Los extremos sueltos del ADN diana se unen al transposón, reparándose los espacios que resultan de los cortes monocatenarios. El resultado es la formación de repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN (de 5 a 10 nucleótidos de longitud) flanqueando al transposón integrado.

a lo largo del genoma. Tras el corte del transposón y de los sitios diana del ADN, la transposasa une los extremos que cuelgan del ADN diana al elemento transponible. El espacio resultante en el ADN diana se repara mediante la síntesis de ADN, seguida por el ligamiento a la otra hebra del transposón. El resultado de este proceso es una repetición directa corta del sitio diana del ADN a ambos lados del elemento transponible —una marca de la integración del transposón—.

Este mecanismo de transposición determina el movimiento del transposón desde un sitio cromosómico a otro. Otros tipos de transposones se mueven mediante un mecanismo más complejo, en el que el transposón se replica de acuerdo con su integración en el nuevo sitio diana. Este mecanismo produce la integración de una copia del transposón en una nueva posición en el genoma, mientras que la otra copia permanece en su posición original.

Los transposones que se trasladan mediante intermediarios de ADN se encuentran presentes en eucariotas además de en bacterias. Por ejemplo, el genoma humano contiene aproximadamente 300.000 transposones de ADN, que constituyen el 3% del ADN humano. Los elementos transponibles originalmente descritos por McClintock en el maíz se trasladan mediante un mecanismo no replicativo, al igual que la mayoría de los elementos transponibles de otras plantas y animales. De igual manera que los transposones bacterianos, estos elementos se mueven a muchos puntos diana diferentes a lo largo del genoma. El movimiento de estos transposones a sitios no específicos del genoma no parece ser muy ventajoso para las células en las que ocurre, pero sin duda ha jugado un papel fundamental en la evolución estimulando las reorganizaciones de ADN.

En levaduras y protozoos, sin embargo, la transposición a través de un mecanismo replicativo es responsable de reorganizaciones programadas del ADN que regulan la expresión génica. En estos casos la transposición se inicia por la acción de una nucleasa específica de sitio que rompe en un sitio diana específico, en donde se inserta una copia del elemento transponible. Los elementos transponibles son por tanto capaces no solo de moverse a sitios no específicos del genoma, sino también de participar en la reorganización específica de genes determinando cambios programados en la expresión génica.

### *Transposición vía intermediarios de ARN*

La mayoría de los transposones en las células eucarióticas son **retrotransposones**, que se trasladan vía transcripción inversa de intermediarios de ARN. En el hombre, hay casi 3 millones de copias de transposones, constituyendo más del 40% del genoma (véase Tabla 4.1). El mecanismo de transposición de estos elementos es similar a la replicación de los retrovirus, los cuales han proporcionado el prototipo de sistema para el estudio de esta clase de secuencias de ADN móviles.

Los **retrovirus** contienen genomas de ARN en sus partículas virales pero se replican mediante la síntesis de un provirus de ADN, que se integra en el cromosoma de ADN de las células infectadas (véase Fig. 3.13). La enzima **transcriptasa inversa** sintetiza una copia de ADN partiendo del ARN viral. A través de este mecanismo se produce la síntesis de una molécula de ADN que contiene repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos en ambos extremos (Fig. 5.49). Estas secuencias repetidas, llamadas **repeticiones terminales largas**, o **LTRs** (del inglés, *long terminal repeats*), surgen de la duplicación de los sitios del ARN donde se unen los cebadores para comenzar la síntesis de

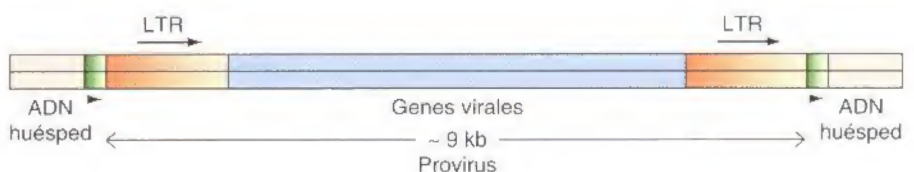



*Figura 5.49*
**Organización de un ADN retroviral.** El ADN proviral integrado está flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR), que son repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos. Los genes virales, incluyendo los genes para la transcriptasa inversa y proteínas estructurales de la partícula viral, están localizados entre las secuencias LTRs. El provirus integrado está flanqueado por repeticiones directas cortas del ADN huésped.

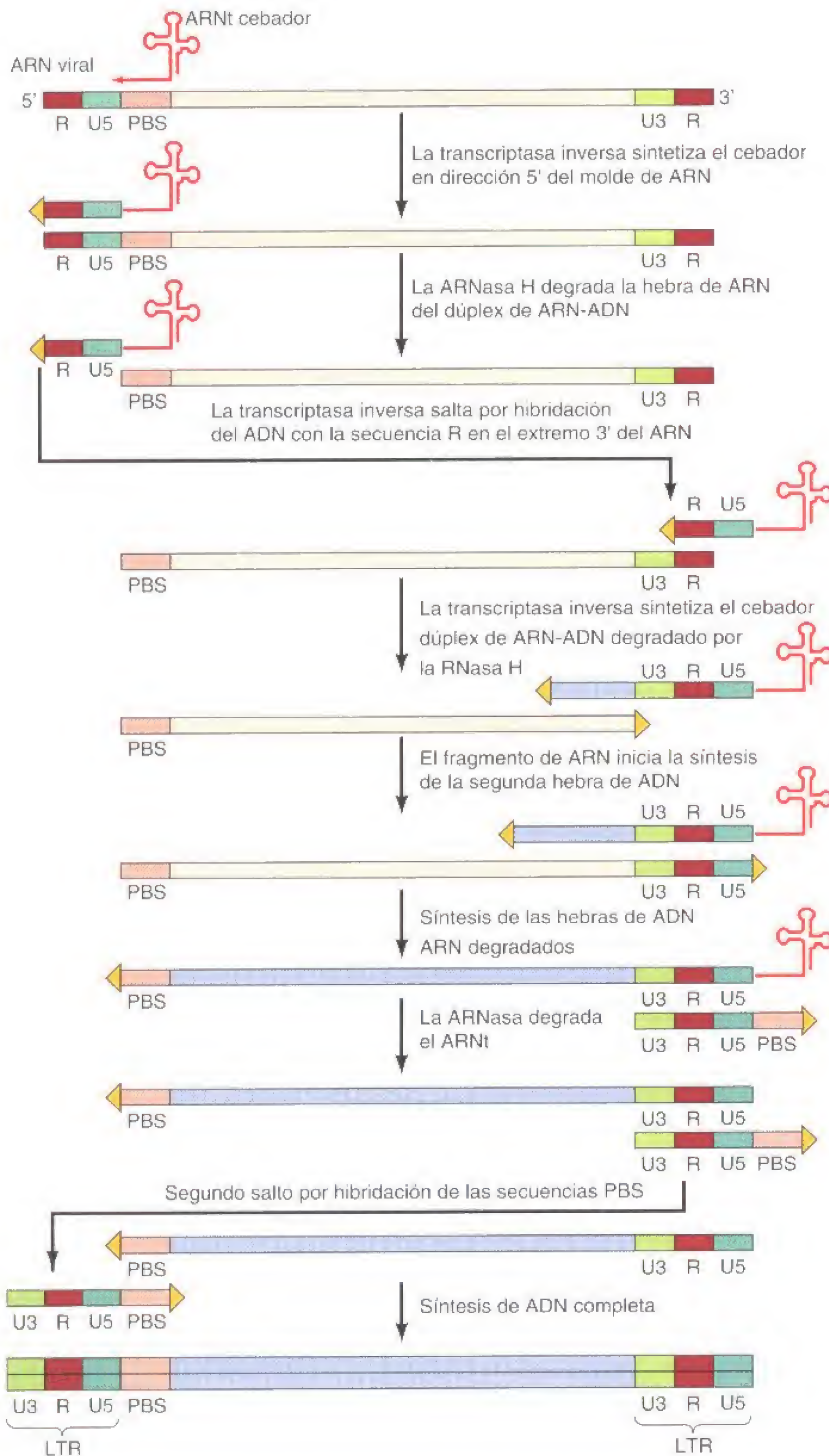



*Figura 5.50*
**Generación de las LTR durante la transcripción inversa.** Las LTR se componen de tres elementos secuenciales: una secuencia de repetición corta (R) de unos 20 nucleótidos que está presente en ambos extremos del ARN viral; una secuencia única del extremo 5' del ARN viral (U5); y una secuencia única del extremo 3' del ARN viral (U3). Las repeticiones de estas secuencias se generan durante la síntesis del ADN cuando la transcriptasa inversa salta dos veces entre los extremos de su molde. La síntesis comienza utilizando un cebador de ARNt unido a un sitio de unión al cebador (PBS) adyacente a U5 en el extremo 5' del ARN viral. La polimerasa copia a R, y la hebra de ARN del híbrido de ARN-ADN es degradada por la ARNasa H. Después la polimerasa salta al extremo 3' del ARN viral para sintetizar una hebra completa de ADN complementaria a la hebra molde de ARN. La polimerasa salta de nuevo durante la síntesis de la segunda hebra de ADN, que también se inicia por la unión de un cebador cerca del extremo 5' de su molde. El resultado de estos saltos es la formación de LTRs que contienen secuencias U3-R-U5.

ADN. Las secuencias LTR se presentan como un elemento central para la transcripción inversa, además de estar implicadas en la integración y posterior transcripción del provirus de ADN.

Como todas las ADN polimerasas, la transcriptasa inversa necesita un cebador, que en el caso de los retrovirus es una molécula de ARNt unida a un sitio específico (sitio de unión del cebador) cerca del extremo 5' del ARN viral

(Fig. 5.50). Puesto que la síntesis del ADN es en el sentido de 5′ a 3′, solamente un pequeño segmento de ADN es sintetizado antes de que la transcriptasa inversa alcance el final de su molde. La continuación de la síntesis del ADN depende de la capacidad de la transcriptasa inversa para «saltar» al extremo 3′ de la molécula molde de ARN. Esto se consigue gracias a la actividad ARNasa H de la transcriptasa inversa, que degrada la hebra de ARN de los híbridos de ADN-ARN. Como resultado, el ADN recién sintetizado se convierte en una molécula de hebra simple, que puede hibridar con alguna secuencia repetida corta que esté presente en los extremos 5′ y 3′ del ARN viral. Por tanto la síntesis del ADN puede continuar, produciendo una molécula de ADN de hebra única complementaria al ARN viral. La síntesis de la hebra opuesta de ADN comienza a través de un fragmento del ARN viral que actúa como iniciador, en un sitio cerca del extremo 3′ de la hebra molde de ADN. De nuevo el resultado es un segmento corto de ADN, que incluye el sitio de unión del cebador copiado a partir del ARNt utilizado como cebador inicial de la transcripción inversa. La secuencia de unión al cebador de ARNt es degradada por la ARNasa H, dejando una hebra de ADN colgando que de nuevo «salta» para emparejarse con su secuencia complementaria al otro extremo del molde. Así, la síntesis del ADN puede continuar una vez más, resultando finalmente un ADN linear con LTRs en ambos extremos.

El ADN viral linear se integra en el cromosoma de la célula huésped mediante un proceso que recuerda a la integración de los elementos transponibles. La integración está catalizada por una proteína de integración viral y se da en muchas secuencias diana diferentes del ADN celular. La proteína de integración rompe dos bases antes de los extremos del ADN viral e introduce un corte monocatenario en el sitio diana del ADN celular. Los extremos colgantes del ADN celular se unen al extremo del ADN viral, y el espacio es rellenado con la síntesis de ADN. El provirus integrado esta por tanto flanqueado por una repetición directa de las secuencias celulares, similar a las repeticiones que flanquean a los transposones de ADN.

El ciclo de vida del virus continua con la transcripción del provirus integrado, que produce ARN genómico viral como ARNm que dirige la síntesis de las proteínas virales (incluyendo la transcriptasa inversa y la proteína de integración). El ARN genómico se empaqueta en las partículas virales, que son liberadas de la célula huésped. Esta progenie viral pueden infectar a una célula nueva, iniciando así otro proceso de síntesis e integración del ADN. El efecto neto podemos definirlo como el movimiento del provirus desde un sitio cromosómico a otro, mediante la síntesis y la transcripción inversa de un intermediario de ARN.

Otros retrotransposones difieren de los retrovirus en que no se empaquetan en partículas infecciosas y por lo tanto no pueden pasar de una célula a otra. Sin embargo, estos retrotransposones pueden moverse a una nueva diana cromosómica dentro de una misma célula, mediante mecanismos fundamentalmente similares a los implicados en la replicación de los retrovirus.

Algunos retrotransposones (denominados elementos semejantes a los retrovirus o retrotransposones LTR) son similares estructuralmente a los retrovi-

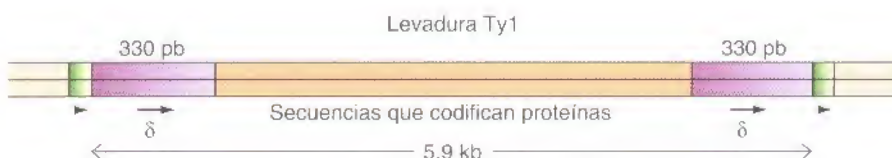



*Figura 5.51*
**Estructura del retrotransposón LTR.** El elemento transponible de levaduras Ty1 presenta la misma organización que un retrovirus. Las secuencias codificadoras de proteínas, incluyendo genes para la transcriptasa inversa y proteínas de integración, están flanqueadas por LTRs (llamados elementos δ) de unas 330 pares de bases (pb). El transposón integrado está flanqueado por repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN.

rus (Figura 5.51). Los retrotransposones de este tipo constituyen aproximadamente el 8% del genoma humano. Poseen secuencias LTR en ambos extremos; codifican la transcriptasa inversa y la integrasa; y se transponen (como retrovirus) mediante la transcripción a ARN, síntesis de una nueva copia de ADN por la transcriptasa inversa e integración en el ADN celular.

Los retrotransposones no LTR difieren de los retrovirus en que no contienen secuencias LTR, aunque sí codifican su propia transcriptasa inversa. En mamíferos, la clase principal de estos retrotransposones consiste en elementos dispersos largos y altamente repetitivos (**LINEs:** *long interspersed elements*), que se repiten aproximadamente 850.000 veces en el genoma y constituyen aproximadamente el 21% del ADN genómico (véase Capítulo 4). Un elemento LINE completo es de 6 a 7 kb de largo, aunque la mayoría de los miembros de la familia están truncados en su extremo 5′ (Fig. 5.52). En su extremo 3′, los LINEs poseen regiones de secuencias ricas en A que se creen derivadas de la transcripción inversa de las colas de poliA que se añaden a los ARNm después de la transcripción (véase Capítulo 6). Al igual que otros elementos transponibles, los LINEs se encuentran flanqueados por pequeñas repeticiones directas del punto diana del ADN, indicando que la integración implica cortes escalonados y reparación por síntesis.

Puesto que los LINEs no contienen secuencias LTR, el mecanismo de su transcripción inversa y posterior integración en el ADN cromosómico debe ser distinto de aquel utilizado por los retrovirus y la clase I (contienen LTRs) de retrotransposones. En particular, la transcripción inversa se inicia con la rotura de un extremo del ADN cromosómico por el sitio de integración , que resulta del corte en el sitio diana del ADN por una nucleasa codificada por el retrotransposón (Fig. 5.53). Se inicia por tanto la transcripción inversa con la cola poli-A en el extremo 3′ del transposón de ARN y que continúa a lo largo de la molécula. La hebra opuesta de ADN se sintetiza utilizando como cebador el otro extremo roto del sitio diana del ADN, resultando así simultáneas la síntesis y la integración del retrotransposón de ADN.

Otros elementos secuenciales, que no codifican su propia transcriptasa inversa, también se transponen vía intermediarios de ARN. Estos elementos incluyen a las secuencias altamente repetitivas cortas dispersas (**SINEs**), de las que existen cerca de un millón de copias en los genomas de los mamíferos (véase Capítulo 4). La principal familia que representa a estos elementos se compone de secuencias *Alu*, que constan aproximadamente de 300 bases de longitud. Estas secuencias son ricas en segmentos de poli-A en sus extremos 3′ y están flanqueadas por duplicaciones cortas de las secuencias diana del ADN, una estructura similar a la de los retrotransposones que carecían de secuencias LTR (p. ej., los LINEs). Los SINEs surgen de la transcripción inversa de pequeños ARN, que incluyen a los ARNt y a pequeños ARN citoplasmáticos implicados en el transporte de proteínas. Puesto que los SINEs no codifican productos funcionales del ARN, representan pseudogenes que se forman por la transposición de ARN. Los pseudogenes de muchos genes codificadores de proteínas (llamados **pseudogenes procesados**) surgen de forma similar a través de la transcripción inversa del ARNm (Fig. 5.54). Estos pseudogenes procesados se

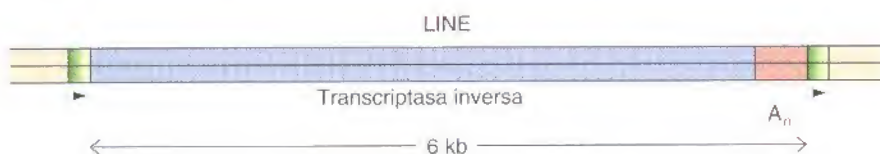



*Figura 5.52*
**Estructura de LINEs humanos.** Los LINEs carecen de LTRs, pero codifican la transcriptasa inversa. Presenta tramos de secuencias ricas en A (designadas $A_n$) en sus extremos 3′, que se cree que derivan de la transcripción inversa de colas de poli-A añadidas al extremo 3′ de los ARNm. Al igual que otros elementos transponibles, los LINEs están flanqueados por repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN.




*Figura 5.53*
**Modelo de transcripción inversa e integrador de LINEs.** El punto diana del ADN es escindido por una nucleasa codificada por el retrotransposón. La transcripción inversa, desencadenada por un extremo roto del ADN diana, se inicia en el interior de la cola de poli-A en el extremo 3' del retrotransposón de ARN. La síntesis de la hebra opuesta del retrotransposón de ADN se desencadena de forma similar por la otra hebra de ADN en el punto diana.

pueden reconocer fácilmente no sólo por la presencia de los segmentos ricos en A sino también por que se han eliminado los intrones que estaban presentes en el correspondiente gen normal durante el procesamiento del ARNm. La transposición de los SINEs y otros pseudogenes procesados se cree que transcurre de manera similar a la transposición de los LINEs. Sin embargo, debido a que estos elementos no incluyen los genes para la transcriptasa inversa u otra nucleasa, su transposición presumiblemente implica la acción de transcriptasas inversas y nucleasas que están codificadas en algún otro lugar del genoma —posiblemente por retrotransposones de clase I o II, como los LINEs—.

Aunque los altamente repetitivos SINEs y LINEs representan una fracción significativa del ADN genómico, su transposición a sitios aleatorios en el genoma parece ser que no resulta muy útil para la célula en la que se encuentran. Estos transposones inducen mutaciones cuando se integran en un sitio diana nuevo, y al igual que las mutaciones inducidas por otros agentes, la mayoría de las mutaciones resultantes de la integración por transposición se espera que sea dañina para la célula. De hecho, las mutaciones se han asociado con algunos casos de hemofilia, distrofia muscular, y cáncer de colon. Por el contrario, algunas mutaciones derivadas de la transposición de estos elementos puede ser beneficiosa, contribuyendo de manera positiva en la evolución de las especies. Por ejemplo, algunos retrotransposones en los genomas de mamíferos contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes adyacentes.

Además de su papel como mutágenos, los retrotransposones también pueden contribuir a la diversidad genética mediante la estimulación de reorganizaciones del ADN. Las secuencias de ADN celular que se encuentran adyacentes a los LINEs con frecuencia se intercambian en el proceso de transposición. Como consecuencia, la transposición de los LINEs puede dar lugar al movimiento de secuencias de ADN celular a sitios nuevos en el genoma. Puesto que los LINEs son capaces de integrarse dentro de genes activos, la transposición

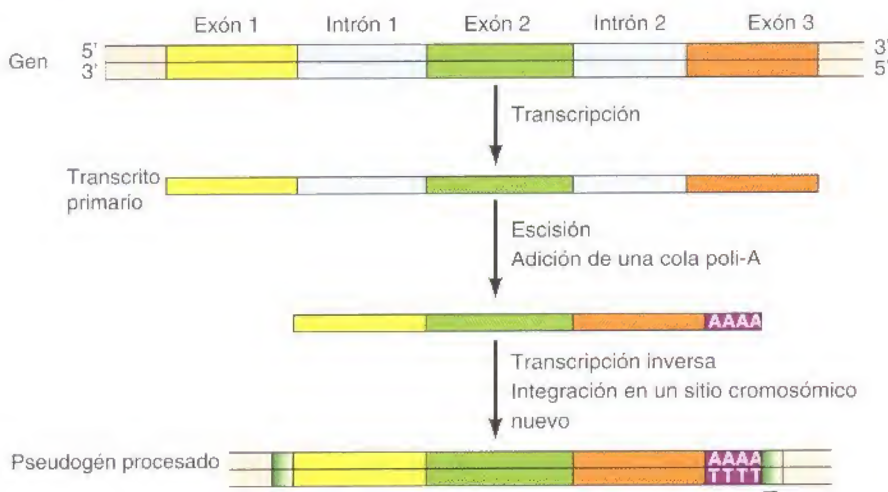



*Figura 5.54*
**Formación de un pseudogén procesado.** El gen ilustrado contiene tres exones, separados por dos intrones. Los intrones se eliminan del transcrito primario mediante escisión, y se añade una cola de poli-A al extremo 3′ del ARNm. La transcripción inversa y la integración producen un pseudogén procesado, que no contiene intrones y presenta un tramo rico en A en su extremo 3′. El pseudogén procesado está flanqueado por repeticiones directas cortas del sitio diana del ADN que se generaron durante la integración.

asociada de las secuencias de ADN celular puede conducir a la formación de nuevas combinaciones de secuencias reguladores y/o codificadoras y contribuir directamente a la evolución de nuevos genes.

La gran mayoría de los elementos transponibles del genoma humano son inactivos, con sólo unas 100 copias de LINEs que mantienen las secuencias codificadoras de proteína necesarias para su transposición. Todos los transposones de ADN humanos y la mayoría de los retrotransposones representan así reliquias de la evolución en lugar de elementos actualmente funcionales. Sin embargo, éste no es el caso en otras especies, incluyendo *Arabidopsis*, *C. elegans*, *Drosophila* y los ratones, que poseen un nivel muy superior de actividad de sus transposones. En el ratón, por ejemplo, los retrotransposones LTR, LINEs y SINEs son todos activos. En consecuencia, se estima que el 10% de todas las mutaciones en los ratones es resultado de los transposones, comparado con sólo en torno a 1 de cada 600 en el hombre. Existe pues una intrigante y notable diferencia en la actividad de los transposones entre los ratones y humanos, cuya explicación est´a todavía por determinar.

## *Amplificación génica*

Las reorganizaciones del ADN que hemos discutido hasta ahora alteraban la posición de una secuencia de ADN dentro del genoma. La **amplificación génica** puede entenderse como un tipo diferente de alteración en la estructura del genoma; incrementa el número de copias de un gen dentro de una célula. La amplificación génica es el resultado de la repetición de la replicación del ADN, produciendo múltiples copias de una región en particular (Fig. 5.55). Las secuencias de ADN amplificadas se pueden encontrar en forma de moléculas extracromosómicas libres o como distribuciones en tándem de secuencias dentro del cromosoma. En cualquier caso, el resultado es el aumento de la expresión del gen amplificado, simplemente debido a que están disponibles más copias del gen que será transcrito.

En algunos casos, la amplificación génica es responsable de aumento programado durante el desarrollo de la expresión genética. El ejemplo clásico es la amplificación de los genes de ARN ribosómico en los oocitos (huevos) de los anfibios. Los huevos son células extremadamente grandes, que requieren una síntesis de proteínas muy alta. Los oocitos de los anfibios en particular son aproximadamente un millón de veces más grandes en volumen que una célula somática típica y deben proporcionar grandes cantidades de síntesis de proteínas durante el desarrollo temprano. Para ello es necesario aumentar la síntesis del ARN ribosómico, resuelta en parte por la amplificación de los genes del ARN

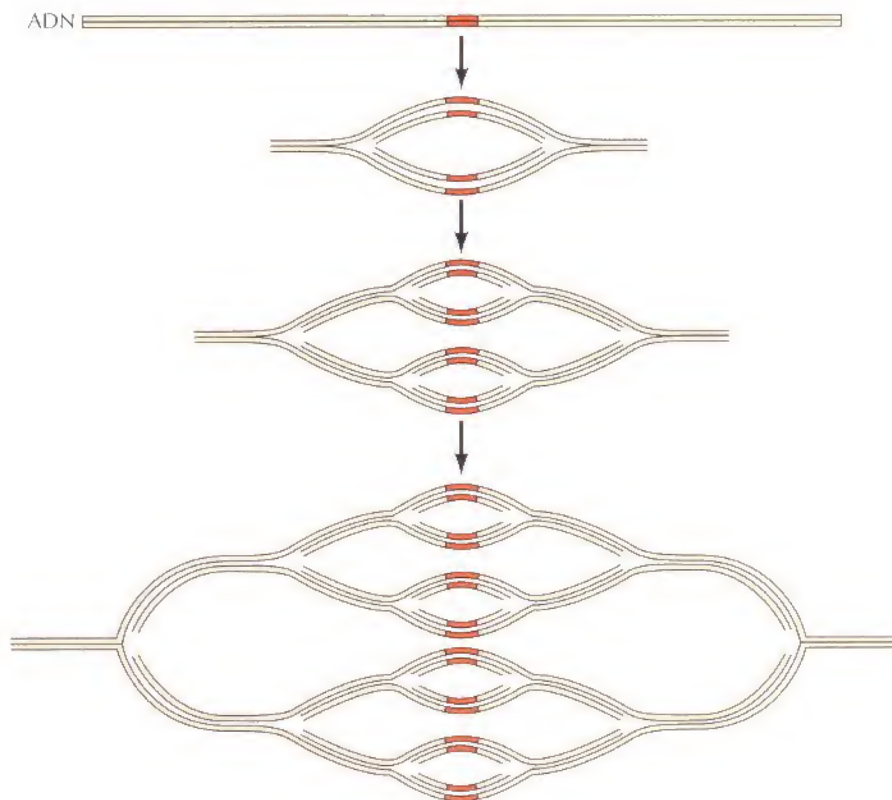



*Figura 5.55*
**Amplificación del ADN.** Repetidas vueltas de replicación del ADN producen múltiples copias de una región cromosómica particular.

ribosómico. Tal y como dijimos en el Capítulo 4, en cada genoma existen varios cientos de copias de genes de ARN ribosómico, de manera que se puede producir el suficiente ARNr para atender las necesidades de las células somáticas. En los huevos de los anfibios, estos genes se amplifican 2.000 veces más, aproximadamente un millón de copias por oocito. Otro ejemplo de amplificación génica programada se da en Drosofila, en donde los genes que codifican a las proteínas del corion (genes del corion) se amplifican en las células del ovario para producir grandes cantidades de estas proteínas. Al igual que otros reorganizaciones programadas, sin embargo, la amplificación génica es un proceso relativamente infrecuente que ocurre en tipos de células altamente especializadas; no es un mecanismo común en la regulación génica.

La amplificación génica también ocurre como un proceso anormal en las células cancerígenas, en las que aumenta la expresión de los genes que contribuyen al crecimiento celular incontrolado. Tal amplificación génica se describió por primera vez en las células cancerígenas que resultaron resistentes al metotrexato, uno de los medicamentos utilizados en la quimioterapia del cáncer. El metotrexato inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa, que está implicada en la síntesis de los dNTPs y por tanto necesaria para la síntesis de ADN. La resistencia al metotrexato con frecuencia se desarrolla a partir de la amplificación del gen dihidrofolato reductasa, produciendo el aumento de la producción de la enzima y como consecuencia la pérdida de la inhibición efectiva del metotrexato. Además, la amplificación génica en las células cancerígenas suele determinar el aumento de la expresión de los genes que dirigen la proliferación celular (oncogenes) contribuyendo así de manera directa al desarrollo del tumor (véase Cap. 15). Por ejemplo, la amplificación del gen *erb*B-2 normalmente está implicada en el cáncer de mama humano. Por tanto, al igual que otros tipos de reorganizaciones del ADN, la amplificación génica puede tener consecuencias benignas o malignas para la célula o el organismo en el que ocurra.

| RESUMEN | PALABRAS CLAVE |
|---|---|
| **REPLICACIÓN DEL ADN** | |
| ***ADN polimerasas***: Distintas ADN polimerasas desempeñan funciones diferentes en la replicación y reparación del ADN en las células procariotas y eucariotas. Todas las ADN polimerasas conocidas sintetizan el ADN exclusivamente en sentido de 5′ a 3′ mediante la adición de dNTPs a la hebra cebadora de ADN. | **ADN polimerasa mutágeno** |
| ***Horquilla de replicación***: Las hebras parentales de ADN se separan y sirven de molde para la síntesis de dos nuevas hebras en la horquilla de replicación. Una de las hebras nuevas de ADN (la hebra conductora) se sintetiza de manera continua; la otra hebra (la hebra rezagada) se forma por la unión de pequeños fragmentos de ADN que son sintetizados «marcha atrás» con respecto al sentido de la replicación. Las ADN polimerasas y otras muchas proteínas actúan de manera coordinada para sintetizar a las hebras conductora y rezagada del ADN. | **horquilla de replicación, fragmento de Okazaki, ADN ligasa, hebra conductora, hebra tardía, primasa, ARNasa H, exonucleasa, helicasa, proteína de unión a la hebra simple de ADN, topoisomerasa** |
| ***Fidelidad de la replicación***: Las ADN polimerasas aumentan la exactitud de la replicación a través de la selección de la base correcta y la doble lectura del ADN recién sintetizado para eliminar las bases desapareadas. | **doble lectura** |
| ***Orígenes e inicio de la replicación***: La replicación del ADN comienza en orígenes específicos de replicación, que contienen los sitios de unión para las proteínas que inician el proceso. | **origen de replicación, secuencia de replicación autónoma (ARS), complejo de origen de replicación (ORC)** |
| ***Telomeros y telomerasa: replicación de los extremos del cromosoma***: Las secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas se replican por la acción de la transcriptasa inversa (telomerasa) que contiene su propio molde de ARN. | **telómero, telomerasa, transcriptasa inversa** |
| **REPARACIÓN DEL ADN** | |
| ***Inversión directa del ADN dañado***: Algunos tipos de lesiones comunes del ADN, como los dímeros de pirimidina y los residuos de guanina alquilados, son reparados por la inversión directa del daño. | **dímero de pirimidina, fotorreactivación** |
| ***Reparación por escisión***: La mayoría de los daños en el ADN son reparados mediante la escisión del ADN dañado. El espacio resultante se rellena con ADN recién sintetizado, usando a la hebra complementaria no dañada como molde. En la reparación por escisión de las bases, se elimina de la molécula de ADN a tipos específicos de bases dañadas. Por el contrario, los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos reconocen a una vasta variedad de bases dañadas como parte de un oligonucleótido. Un tercer tipo de sistema de reparación por escisión elimina específicamente las bases desemparejadas de las hebras de ADN recién sintetizadas. | **reparación por escisión de bases, ADN glicosilasa, AP endonucleasa, reparación por escisión de nucleótidos, escinucleasa, reparación acoplada a la transcripción, reparación de errores** |
| ***Reparación propensa al error:*** ADN polimerasas especializadas son capaces de replicar el ADN opuesto a un punto de ADN dañado, aunque la acción de estas polimerasas resulta en una elevada frecuencia de incorporación de bases incorrectas. | **reparación propensa al error** |
| ***Reparación recombinatoria:*** El ADN dañado puede ser reemplazado mediante recombinación con una molécula no dañada. Este mecanismo juega un papel importante en la reparación de daños que se encuentran durante la replicación del ADN, además de en la reparación de roturas de doble hebra. | **reparación recombinatoria** |

## RECOMBINACIÓN ENTRE SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE ADN

***Las moléculas de ADN se recombinan mediante rotura y unión***: El mecanismo molecular de la recombinación implica la rotura y la unión de las moléculas parentales de ADN.

**recombinación homóloga general, modelo de Holliday, unión o intermediario de Holliday**

***Modelos de recombinación homóloga***: La alineación entre las moléculas de ADN homólogas proporciona el apareamiento complementario de las bases. Las hebras de ADN parental «melladas» invaden a la otra molécula parental, produciendo un intermediario de hebras cruzadas conocido como unión o intermediario de Holliday. Las moléculas recombinantes se forman después por escisión y unión de las hebras cruzadas.

**RecA**

***Enzimas involucradas en la recombinación homóloga***: La enzima central de la recombinación homóloga es RecA, que cataliza el intercambio de hebras entre los ADN homólogos. Otras enzimas cortan y desenrollan los ADN parentales y resuelven las uniones de Holliday.

## REORGANIZAMIENTOS DEL ADN

**recombinación específica de sitio, lisogenia, antígeno, inmunoglobulina, receptor de células T**

***Recombinación específica de sitio:*** La recombinación específica de sitio tiene lugar entre secuencias específicas de ADN que son reconocidas por proteínas que permiten el proceso. En los vertebrados, la recombinación específica de sitio desempeña un papel esencial en la generación de inmunoglobulinas y genes de los receptores de las células T durante el desarrollo del sistema inmune.

**transposición, elemento transponible, transposón**

***Transposición vía intermediarios de ADN***: La mayoría de los transposones se mueven a lo largo del genoma sin necesidad secuencias específicas de ADN en sus sitios de inserción. En levaduras y protozoos, sin embargo, la transposición de algunas secuencias de ADN a dianas específicas son el resultado de organizaciones programadas del ADN que regulan la expresión génica.

**retrovirus, transcriptasa inversa, repetición terminal larga (LTR), retrotransposon, LINE, SINE, pseudogén procesado**

***Transposición vía intermediarios de ARN***: La mayoría de los transposones en las células eucariotas se mueven mediante la transcripción inversa de intermediarios de ARN, de forma similar a la replicación de los retrovirus. Estos retrotransposones incluyen a las secuencias altamente repetitivas LINE y SINE de los genomas de mamíferos.

**amplificación génica**

***Amplificación génica***: La amplificación génica resulta de la replicación repetitiva de una región cromosómica. En algunos casos, la amplificación genética proporciona un mecanismo de aumento de la expresión de los genes durante el desarrollo. La amplificación génica también se produce con frecuencia en las células cancerígenas, pudiendo originar la elevada expresión de los genes que contribuyen a la proliferación celular incontrolada.

# Preguntas

1. Discute los papeles desempeñados por las diferentes ADN polimerasas de *E. coli*.
2. ¿Qué es un fragmento de Okazaki? ¿Cómo se convierten en una hebra continua?
3. Compara la acción de las topoisomerasas I y II.
4. ¿Cómo averiguarías en una levadura si una secuencia de ADN posee un origen de replicación o una secuencia de replicación autónoma (ARS)?
5. ¿Por qué posee el genoma humano miles de orígenes de replicación y el genoma de *E. coli* sólo contiene uno?
6. ¿Cómo empieza la síntesis de ADN en el origen de replicación?
7. ¿Cómo extiende la telomerasa los extremos cromosómicos para compensar la incapacidad de la ADN polimerasa de completar la replicación del ADN en los extremos cromosómicos?
8. Explica el proceso de reparación por escisión de nucleótidos.
9. ¿Cómo puede una célula reparar una rotura de doble hebra en su ADN?
10. ¿Cómo está relacionado el cáncer de mama con un mecanismo de reparación de ADN?

**11.** Los pacientes de xeroderma pigmentosa sufren una incidencia altísima de cáncer de piel aunque no se ha encontrado la misma incidencia en cánceres de órganos internos (p. ej., cáncer de colon). ¿Qué sugiere esto acerca de los daños del ADN responsables de la mayoría de los cánceres internos?

**12.** ¿Qué fenotipo tendría un ratón mutante que carece de uno de los genes necesarios para la recombinación específica de sitio en los linfocitos?

**13.** Muchos medicamentos de uso clínico y bajo evaluación para el tratamiento del sida son inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH. ¿Qué transcriptasas en las células humanas serían también inhibidas por estos medicamentos? ¿Cuáles serían las consecuencias de la inhibición de estas enzimas?

## Bibliografía

### *Replicación del ADN*


Baker, T. A. and S. P. Bell. 1998. Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell* 92: 296-305. [R]

Bell, S. P. 2002. The origin replication complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.* 16: 659-672. [R]

Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 333-374. [R]

Benkovic, S. J., A. M. Valentine and F. Salinas. 2001. Replisome-mediated DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 181-208. [R]

Blackburn, E. H. 1992. Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 113-129. [R]

Cairns, J. 1963. The chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 43-46. [P]

Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 369-413. [R]

Ellison, V. and B. Stillman. 2001. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* 106: 655-660. [R]

Frick, D. N. and C. C. Richardson. 2001. DNA primases. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 39-80. [R]

Gilbert, D. M. 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294: 96-100. [R]

Goodman, M. F. 1997. Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10493-10495. [R]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327-341. [P]

Hubscher, U., G. Maga and S. Spadari. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 133-163. [R]

Kornberg, A., I. R. Lehman, M. J. Bessman and E. S. Simms. 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 197-198. [P]

Kunkel, T. A. and K. Bebenek. 2000. DNA replication fidelity. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 497-529. [R]

Lohman, T. M. and K. P. Bjornson. 1996. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 169-214. [R]

McEachern, M. J., A Krauskopf and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. *Ann. Rev. Genet.* 34: 331-358. [R]

Ogawa, T. and T. Okazaki. 1980. Discontinuous DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 421-457. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43. [P]

Waga, S. and B. Stillman. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 369: 207-212. [P]

Waga, S. and B. Stillman. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 721-751. [R]

West, S. C. 1996. DNA helicases: New breeds of translocating motors and molecular pumps. *Cell* 86: 177-180. [R]

Wold, M. S. 1997. Replication protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 61-92. [R]

Zakian, V. A. 1995. Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270: 1601-1607. [R]


### *Reparación del ADN*


Batty, D. P. and R. D. Wood. 2000.Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241: 193-204. [R]

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652-656. [P]

Cox, M. M. 2001. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Ann. Rev. Genet.* 35: 53-82. [R]

De Laat, W. L., N. G. J. Jaspers and J. H. J. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13: 768-785. [R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038. [P]

Friedberg, E. C., R. Wagner and M. Radman. 2002. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* 296: 1627-1630. [R]

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, D.C.: ASM Press.

Goodman, M. F. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 17-50. [R]

Harfe, B. D. and S. Jinks-Robertson. 2000. DNA mismatch repair and genetic instability. *Ann. Rev. Genet.* 34: 359-399. [R]

Hoeijmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374. [R]

Khanna, K. K. and S. P. Jackson. 2001. DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27: 247-254. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215-1225. [P]

Livneh, Z. 2001. DNA damage control by novel DNA polymerases: translesion replication and mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276: 25639-25642. [R]

Modrich, P. 1997. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 24727-24730. [R]

Sancar, A. 1996. DNA excision repair. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 43-81. [R]

Seeberg, E., L. Eide and M. Bjoras. 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 20: 391-397. [R]

Svejstrup, J. Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 21-29. [R]

Wood, R. D. 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 23465-23468. [R]


### *Recombinación entre las secuencias de ADN homólogas*


Baumann, P. and S. C. West. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.* 23: 247-251. [R]

DasGupta, C., A. M. Wu, R. Kahn, R. P. Cunningham and C. M. Radding. 1981. Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by *E. coli* RecA protein. *Cell* 25: 507-516. [P]

Haber, J. E. and W.-D. Heyer. 2001. The fuss about Mus81. *Cell* 107: 551-554. [R]

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282-304. [P]

Kowalczykowski, S. C. and A. K. Eggleston. 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 991-1043. [R]

Meselson, M. and J. J. Weigle. 1961. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 857-868. [P]

Potter, H. and D. Dressler. 1976. On the mechanism of genetic recombination: Electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3000-3004. [P]

Radding, C. M. 1991. Helical interactions in homologous pairing and strand exchange

driven by RecA protein. *J. Biol. Chem.* 266: 5355-5358. [R]

Shinohara, A. and T. Ogawa. 1995. Homologous recombination and the roles of double strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20: 387-391. [R]

Smith, G. R. 2001. Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Ann. Rev. Genet.* 35: 243-274. [R]

Stahl, F. 1996. Meiotic recombination in yeast: Coronation of the double-strand-break repair model. *Cell* 87: 965-968. [R]

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35. [P]

Taylor, A. F. 1992. Movement and resolution of Holliday junctions by enzymes from *E. coli. Cell* 69: 1063-1065. [R]

West, S. C. 1992. Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 603-640. [R]

West, S. C. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Ann. Rev. Genet.* 31: 213-244. [R]

### *Reordenamientos del ADN*

Bassing, C. H., W. Swat and F. W. Alt. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109: S45-S55. [R]

Boeke, J. D., D. J. Garfinkel, C. A. Styles and G. R. Fink. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40: 491-500. [P]

Craig, N. L. 1995. Unity in transposition reactions. *Science* 270: 253-254. [R]

Craig, N. L. 1997. Target site selection in transposition. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 437-474. [R]

Davis, M. M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 475-496. [R]

Fedoroff, N. V. 2000. Transposons and genome evolution in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7002-7007. [R]

Fedoroff, N. and D. Botstein. 1992. *The Dynamic Genome: Barbara McClintock's Ideas in the Century of Genetics.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Finnegan, D. J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5: 103-107. [R]

Gilboa, E., S. W. Mitra, S. Goff and D. Baltimore. 1979. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* 18: 93-100. [P]

Haren, L., B. Ton-Hoang and M. Chandler. 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 245-281. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immuno globulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628-3632. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Kidwell, M. G. and D. Lisch. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711. [R]

Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of l site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 913-949. [R]

Lewis, S. and M. Gellert. 1989. The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* 59: 585-588. [R]

McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21: 197-216. [P]

Moran, J. V., R. J. DeBerardinis and H. H. Kazazian Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retro transposition. *Science* 283: 1530-1534. [P]

Ostertag, E. M. and H. H. Kazazian Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Ann. Rev. Genet.* 35: 501-538. [R]

Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto and G. M. Wahl. 1989. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57: 901-908. [R]

Stark, G. R. and G. M. Wahl. 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 447-491. [R]

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351. [P]

Weiner, A. M., P. L. Deininger and A. Efstratiadis. 1986. Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 631-661. [R]

# 6 Síntesis y maduración del ARN



EN LOS CAPÍTULOS 4 Y 5 SE TRATA LA ORGANIZACIÓN y mantenimiento del ADN genómico, que es considerado como el conjunto de instrucciones que dirigen todas las actividades celulares. Estas instrucciones se llevan a cabo por medio de la síntesis de ARNs y proteínas. El comportamiento de una célula está determinado no sólo por el conjunto de genes que ha heredado sino también por cuales de estos genes se expresan en un momento determinado. La regulación de la expresión génica permite a las células adaptarse a los cambios en el ambiente y es responsable de las distintas actividades llevadas a cabo por los múltiples tipos celulares que componen a los animales y plantas complejos. Las células musculares y hepáticas, por ejemplo, contienen los mismos genes; la función de estas células está determinada no por diferencias en sus genomas, sino por patrones regulados de expresión génica que dirigen el desarrollo y la diferenciación.

El primer paso en la expresión de un gen, la transcripción del ADN a ARN, es el nivel primario de regulación de la expresión génica en procariotas y eucariotas. En células eucariotas los ARNs son modificados de varias formas —por ejemplo, eliminando los intrones por corte y empalmado— para transformar el transcrito primario en su forma funcional. Los distintos tipos de ARN tienen diferentes funciones en las células: el ARN mensajero (ARNm) sirve de molde para la síntesis de proteínas; el ARN ribosómico (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt) participan en la traducción del ARNm. Otros ARN de pequeño tamaño intervienen en el corte y empalmado de ARNm y en la clasificación de proteínas en eucariotas. En este capítulo se discuten los procesos de síntesis y maduración del ARN. El paso final de la expresión génica, la traducción del ARNm a proteínas, es el tema del Capítulo 7.

## Transcripción en procariotas

Como en la mayoría de las áreas de la biología molecular, el estudio de *E. coli* ha proporcionado el modelo para posteriores investigaciones acerca de la transcripción en eucariotas. El ARNm fue descubierto en primer lugar en la *E.coli*, como fue expuesto en el Capítulo 3. También fue *E. coli* el primer organismo del que se aisló y purificó la ARN polimerasa. A partir de experimentos en *E. coli* fueron aclarados los mecanismos básicos por los que se regula la transcripción. En estos ensayos se observó que la regulación de la expresión génica posibilita al organismo a responder a cambios en su entorno, como variaciones en la disponibilidad de nutrientes. La comprensión de la transcripción en *E.coli* ha supuesto la base para los estudios acerca de los mecanis-

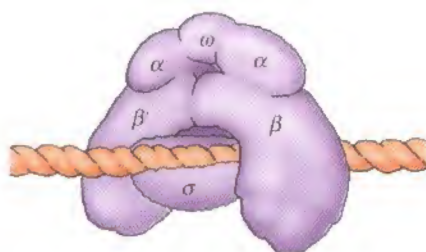



*Figura 6.1*
**ARN polimerasa de *E. coli*.** La enzima completa consta de seis subunidades: dos α, una β, una β', una ω y una σ. La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y puede disociarse de las otras cuatro subunidades, que constituyen el núcleo de la polimerasa.

mos que regulan la expresión génica en eucariotas, de mucha mayor complejidad.

## *ARN polimerasa y transcripción*

La principal enzima responsable de la síntesis de ARN es la **ARN polimerasa**, que cataliza la polimerización de ribonucleósidos 5'-trifosfato (NTPs) dirigida por un molde de ADN. La síntesis de ARN es similar a la de ADN, y como la ADN polimerasa, la ARN polimerasa cataliza el crecimiento de la cadena de ARN en dirección 5'-3'. Sin embargo, a diferencia de la ADN polimerasa, la ARN polimerasa no requiere un cebador preformado para iniciar la síntesis de ARN. En lugar de ello, la transcripción empieza *de novo* en secuencias específicas al principio de los genes. El proceso de iniciación es especialmente importante porque es el primer paso que regula la transcripción.

La ARN polimerasa de *E. coli*, como la ADN polimerasa, es una enzima compleja compuesta de múltiples cadenas polipeptídicas. La enzima intacta se compone de cuatro tipos distintos de subunidades, denominadas α, β, β', ω y σ (Fig. 6.1). La subunidad σ está unida de forma relativamente débil y al separarse del resto de las subunidades permanece unida al ADN el núcleo de la polimerasa, compuesto por dos subunidades α, una β, una β', y una ω. El núcleo de la polimerasa es totalmente capaz de catalizar la incorporación de NTPs al ARN, lo cual implica que la subunidad σ no es necesaria para la actividad catalítica básica de la enzima. Sin embargo el núcleo de la polimerasa no se une específicamente a las secuencias que señalizan la iniciación normal de la transcripción; por lo tanto, la subunidad σ es necesaria para identificar los lugares adecuados para iniciar la transcripción. La selección de estos sitios es un elemento crítico en la transcripción, porque la síntesis de un ARN funcionante debe comenzar al principio del gen.

La secuencia de ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen se denomina **promotor**. Las secuencias de ADN cuya función es actuar de promotores fueron identificadas en primer lugar en *E.coli* comparando las secuencias nucleotídicas de una serie de genes aislados. Esta comparación reveló que en la región corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción existen dos tramos de secuencias que son similares en muchos genes. Estas regiones comunes abarcan seis nucleótidos cada una, y se encuentran aproximadamente a 10 y 35 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 6.2). Se conocen como secuencias −10 y −35, indicando su posición relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción, que se define como el sitio +1. Las secuencias −10 y −35 de distintos promotores no son idénticas, pero tienen una similitud suficiente para establecer secuencias de consenso —las bases más frecuentemente encontradas en cada posición—.

Diversas fuentes de evidencia experimental han puesto de manifiesto la importancia funcional de las secuencias promotoras −10 y −35. En primer lugar, los genes con promotores que difieren las secuencias consenso son transcritos de una forma menos eficiente que aquellos genes cuyos promotores se asemejan más a las secuencias consenso. Segundo, las mutaciones introducidas en

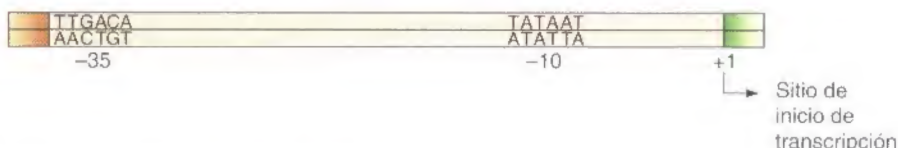



*Figura 6.2*
**Secuencias de los promotores de *E. coli*.** Los promotores de *E. coli* se componen de dos grupos de secuencias localizadas a 10 y 35 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (+1). Las secuencias consenso representadas son las bases más frecuentemente encontradas en diferentes promotores.

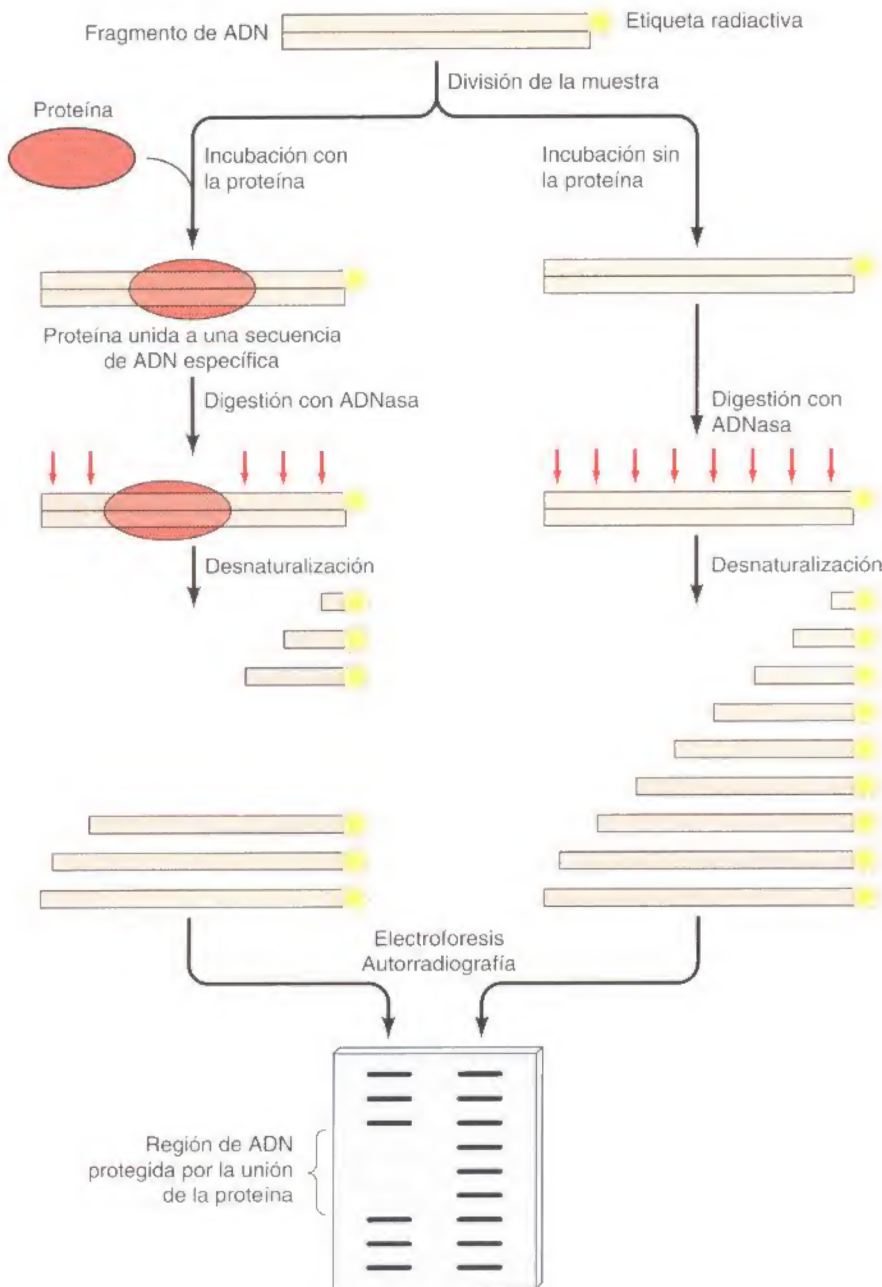



*Figura 6.3*
**Técnica del *footprinting* del ADN.** Se divide en dos una muestra que contiene fragmentos de ADN marcados radiactivamente en un extremo, y una mitad de la muestra se incuba con una proteína que se une a una secuencia específica de ADN dentro del fragmento. Ambas muestras son digeridas con una ADNasa, de tal forma que la ADNAsa introduzca una media de un corte por molécula. La región de DNA unida a la proteína está protegida de la digestión por la ADNasa. Los complejos ADN-proteína son desnaturalizados, y se analiza mediante electroforesis el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por la ADNasa y marcados radiactivamente (igual que para la secuenciación del ADN). En la muestra de ADN que fue incubada con la proteína están ausentes los fragmentos de ADN resultantes de la digestión por la ADNasa de la región protegida por la unión de dicha proteína.

cualquiera de las dos secuencias consenso tienen un gran efecto en la función promotora. En tercer lugar, los sitios de unión de la ARN polimerasa a los promotores han sido identificados mediante la **técnica del *footprinting***, utilizada de forma habitual para determinar los sitios en los que se unen las proteínas al ADN (Fig. 6.3). En este tipo de ensayos se marca radiactivamente el extremo de una molécula de ADN. El ADN marcado se incuba con la proteína de interés (p. ej., ARN polimerasa) y se somete a digestión parcial por medio de una ADNasa. El método se basa en que las regiones a las que se une la proteína quedan protegidas de la digestión por la ADNasa. Estas regiones son identificables por comparación de los productos de digestión del ADN unido a proteína con los obtenidos por digestión de una muestra idéntica de ADN que no fue incubada con proteína. Se pueden utilizar variaciones de la técnica básica, empleando reactivos químicos para modificar y cortar el ADN en determinados nucleótidos,

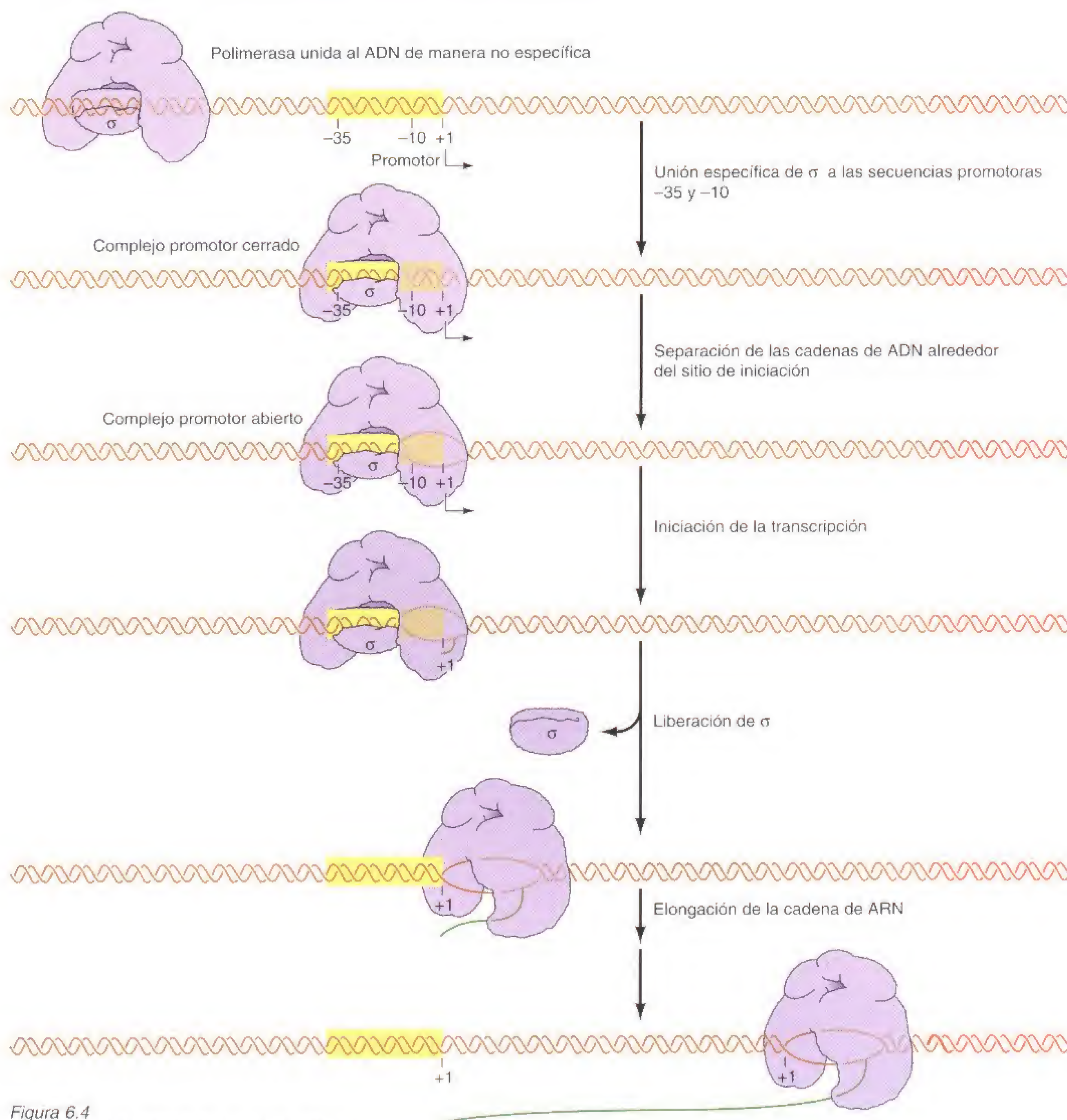



*Figura 6.4*
**Transcripción mediante la ARN polimerasa de *E. coli*.** La polimerasa se une inicialmente al ADN de forma no específica y recorre la molécula hasta que la subunidad σ se une a los promotores −35 y −10, dando lugar a un complejo promotor cerrado. Entonces la polimerasa va separando las dos cadenas de ADN alrededor del sitio de iniciación, y comienza la transcripción mediante la polimerización de los NTPs libres. La subunidad σ se separa del núcleo de la polimerasa, que se desplaza a lo largo del ADN y va alargando la cadena de ARN en crecimiento.

con el objetivo de identificar las bases que están en contacto con la proteína. Estos ensayos han mostrado que la ARN polimerasa generalmente se une a los promotores en una región de unos 60 pares de bases, que va de −40 a +20 (desde el nucleótido 40 corriente arriba al nucleótido +20 corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción). La subunidad σ se une específicamente a las secuencias de las regiones promotoras −10 y −35, corroborando la importancia de estas secuencias en la función de los promotores de la transcripción. Algunos promotores de *E. coli* poseen una tercera secuencia, corriente arriba de la región −35, a la que se une la subunidad σ de la ARN polimerasa.

En ausencia de la subunidad $\sigma$, la ARN polimerasa se une al ADN de forma no específica y con baja afinidad. La función de $\sigma$ es dirigir a la polimerasa a los promotores uniéndose específicamente a las secuencias −35 y −10, para iniciar la transcripción en el principio del gen (Fig. 6.4). El conjunto formado inicialmente entre la polimerasa y el promotor se denomina complejo promotor cerrado dado que el ADN no está desenrollado. La polimerasa después desenrolla unas 15 bases de ADN alrededor del sitio de inicio para dar un complejo promotor abierto en el que ya está disponible una hebra única de ADN para servir como molde para su transcripción, la cual comienza con la incorporación de dos NTPs. Tras la adición de unos diez nucleótidos la subunidad $\sigma$ se separa de la polimerasa, que abandona la secuencia promotora y progresa sobre el molde de ADN para continuar la elongación de la cadena de ARN.

Durante la elongación, la polimerasa permanece asociada con su molde mientras continúa la síntesis de ARNm. A medida que avanza, la polimerasa desenrolla el molde de ADN que tiene por delante y vuelve a enrollar el ADN que queda detrás, manteniendo una región desenrollada de unas 15 pares de bases en la región de transcripción. El análisis estructural de alta resolución de la ARN polimerasa bacteriana indica que las subunidades $\beta$ y $\beta'$ forman una estructura en forma de pinza de cangrejo que sujeta el molde de ADN (Fig. 6.5). Una canal interno entre las subunidades $\beta$ y $\beta'$ acomoda aproximadamente 20 pares de bases de ADN y contiene el centro activo de la polimerasa.

La síntesis de ARN continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación, tras lo cual se detiene la transcripción, se separan el ARN y la polimerasa y la enzima se disocia del molde de ADN. La señal de terminación más simple y común en *E. coli* consiste en una secuencia palindrómica rica en GC seguida de cuatro o más residuos de A (Fig. 6.6). La transcripción de la región rica en GC da lugar a un segmento de ARN que forma una horquilla estable por apareamiento complementario de bases. La formación de una estructura autocomplementaria en el ARN altera su unión con el molde de ADN y finaliza la transcripción. Dado que los enlaces A-U son más débiles que los G-C, se cree que la presencia de residuos A corriente abajo de la secuencia palindrómica facilita la disociación del ARN del molde. Aparte de la formación de horquillas en el ARN, tanto en procariotas como en eucariotas existen otros tipos de señales de terminación de la transcripción, que dependen de la unión a secuencias específicas de ADN de proteínas finalizadoras de la transcripción.

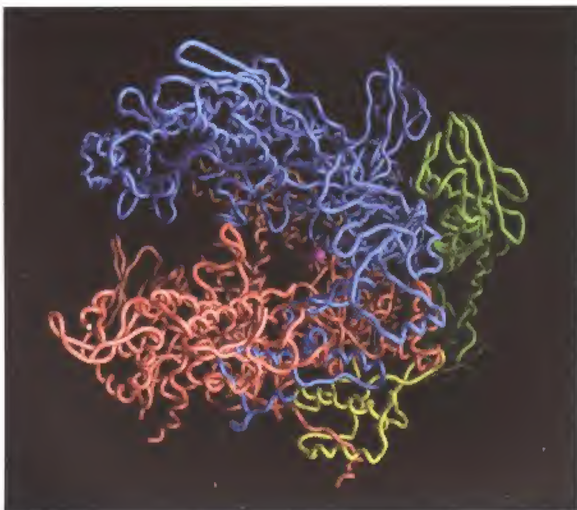
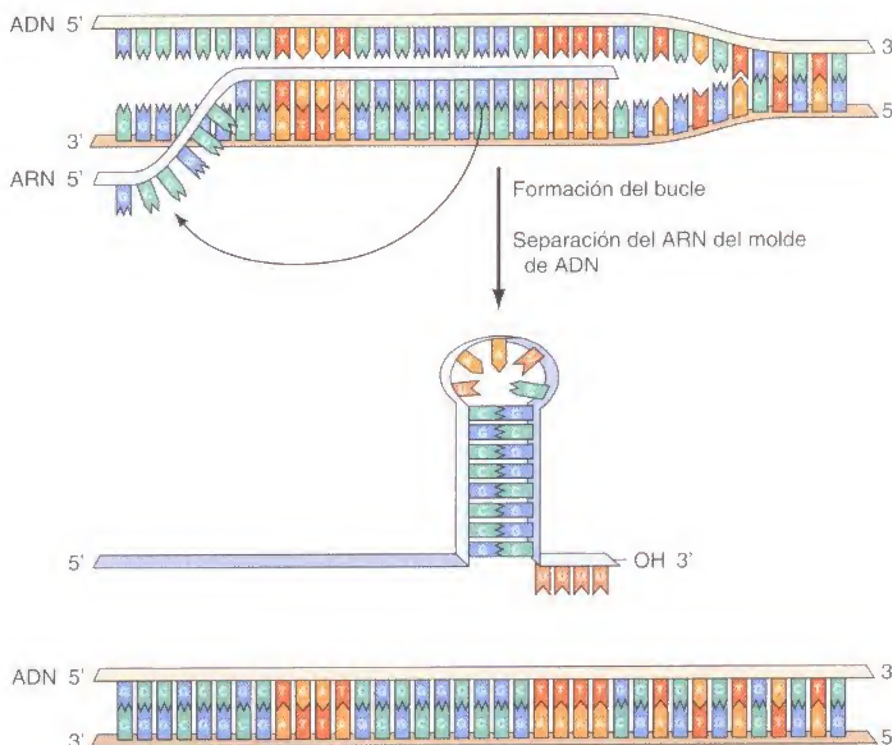


*Figura 6.5*
**Estructura de la ARN polimerasa bacteriana.** Las subunidades $\alpha$ de la polimerasa aparecen de color verde claro y verde oscuro, $\beta$ en azul, $\beta'$ en rosa y $\omega$ en amarillo. (Cortesía de Seth Darse, Rockefeller University.)

*Figura 6.6*
**Terminación de la transcripción.** La terminación de la transcripción está señalada por una repetición invertida rica en G-C seguida de cuatro residuos A. La repetición invertida forma en el ARN una estructura tipo bucle estable que obliga al ARN a disociarse del molde de ADN.




## *Control negativo de la transcripción y represores*

Los estudios pioneros sobre regulación génica en *E.coli* fueron llevados a cabo por François Jacob y Jacques Monod en los años 50. Estos investigadores y sus colaboradores analizaron la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa, que es una fuente de carbonos y energía tras ser hidrolizada a glucosa y galactosa (Fig. 6.7). La enzima que cataliza esta reacción ($\beta$-galactosidasa) y otras enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa están presentes únicamente cuando existe lactosa en el medio. En caso contrario la bacteria es capaz de economizar no invirtiendo energía en la síntesis innecesaria de ARN y proteínas. Por lo tanto, la lactosa induce la síntesis de las enzimas implicadas en su metabolismo. En el metabolismo de la lactosa intervienen otras dos enzimas cuyos genes se encuentran muy ligados al de la $\beta$-galactosidasa: son la galactósido permeasa, que transporta lactosa al interior de la célula, y una transacetilasa, cuya función en esta vía metabólica todavía se desconoce. Basándose en experimentos puramente genéticos, Jacob y Monod dedujeron el mecanismo de regulación de estos genes, formulando un modelo que sigue vigente para el entendimiento de la regulación transcripcional.

El punto de partida en estos experimentos fue el aislamiento de mutantes que eran defectivos en la regulación de los genes implicados en la utilización de lactosa. Estos mutantes eran de dos tipos: mutantes constitutivos, que expresan los tres genes incluso en ausencia de lactosa y mutantes no inducibles, que son incapaces de expresar los genes incluso en presencia del sustrato. Por mapeo genético fueron localizados los dos *loci* de las mutaciones, denominados *o* e *i*, corriente arriba del gen de la $\beta$-galactosidasa. Las mutaciones en *o* daban expresión constitutiva; los mutantes en *i* podían ser tanto constitutivos o como no inducibles.

Se determinó la función de estos genes en experimentos en los que se cruzaron dos cepas bacterianas, dando cepas diploides con mezcla de genes de

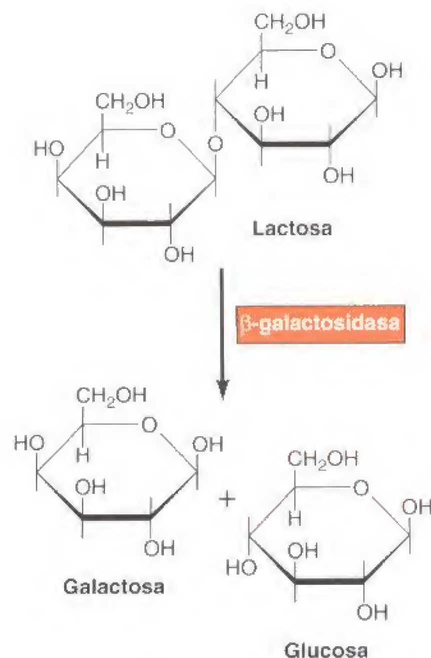



*Figura 6.7*
**Metabolismo de la lactosa.** La $\beta$-galactosidasa cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.

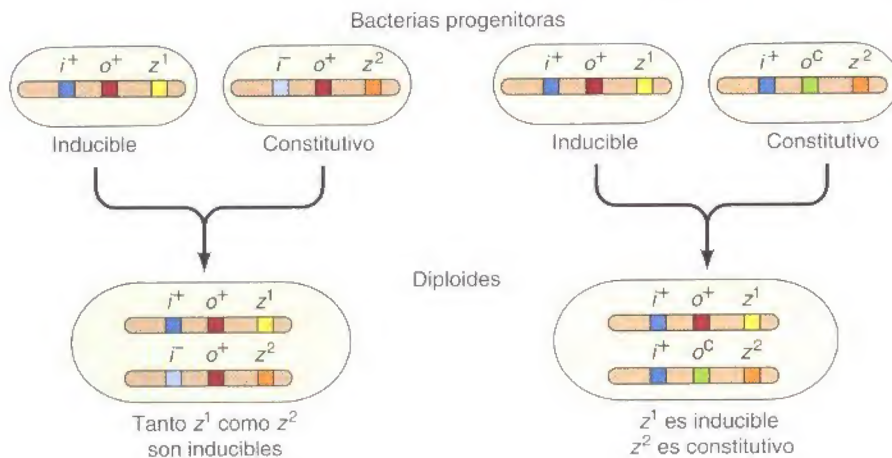



*Figura 6.8*
**Regulación de la β-galactosidasa en *E. coli* diploide.** El cruzamiento de dos cepas bacterianas produce células diploides que contienen genes de ambos progenitores. En estos ejemplos se asume que los genes que codifican la β-galactosidasa (los genes *z*) pueden distinguirse mediante las mutaciones génicas estructurales, designando $z^1$ y $z^2$. En un diploide $i^+/i^-$ (izquierda), ambos genes estructurales son inducibles; por tanto, $i^+$ es dominante sobre $i^-$ y afecta a la expresión de los genes *z* en ambos cromosomas. Por el contrario, en un diploide $o^c/o^+$ (derecha) el gen *z* ligado al $o^c$ se expresa de forma constitutiva, mientras que el ligado al $o^+$ es inducible. Por tanto, el *o* afecta a la expresión sólo del gen *z* adyacente en el mismo cromosoma.

ambos progenitores (Fig. 6.8). El análisis de la expresión génica en estas bacterias diploides proporcionó una serie de observaciones de gran importancia al definir qué alelos de los genes reguladores eran dominantes y cuales recesivos. Por ejemplo, cuando una bacteria con un gen *i* normal ($i^+$) se cruza con otra portadora de una mutación en *i* produciendo expresión constitutiva (una mutación $i^-$), la bacteria diploide resultante muestra una inductibilidad normal; por lo tanto, el gen normal $i^+$ es dominante respecto al gen mutado $i^-$. Sin embargo, el cruzamiento de bacterias normales con otras portadoras de una mutación $o^c$ (expresión constitutiva) produce cepas con el fenotipo de expresión constitutiva, indicando que $o^c$ es dominante sobre $o^+$. Experimentos adicionales en los que se combinaron mutaciones en *o* e *i* con diferentes mutaciones en los genes estructurales mostraron que *o* afecta únicamente la expresión de los genes a los que está físicamente unido, mientras que *i* afecta la expresión de genes en las dos copias cromosómicas de bacterias diploides. Esto es, en una bacteria $o^c/o^+$, solo los genes estructurales unidos a $o^c$ se expresan de forma constitutiva. Por el contrario, en un organismo $i^+/i^-$, los genes estructurales de ambos cromosomas se regulan con normalidad. Estos resultados llevaron a la conclusión de que *o* representa una zona de ADN que controla la transcripción de genes adyacentes, mientras que el gen *i* codifica un factor regulador (p. ej., una proteína) que difunde a través de la célula y controla los genes de ambos cromosomas.

El modelo de regulación génica desarrollado a partir de estos experimentos se ilustra en la Figura 6.9. Los genes que codifican la β-galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa se expresan como una unidad, denominada **operón**. La transcripción del operón es controlada por *o* (el **operador**), situado cerca del sitio de inicio de la transcripción. El gen *i* codifica una proteína que regula la transcripción por medio de su unión con el operador. Dado que las mutaciones $i^-$ (que producen expresión constitutiva) son recesivas, se llegó a la conclusión de que estas mutaciones conllevan la existencia de un defecto en un producto génico funcional, lo cual a su vez implica que el producto normal del gen *i* es un **represor**, que bloquea la transcripción cuando se une a *o*. La existencia de lactosa induce al operón porque la lactosa se une al represor, impidiendo que se una al operador del ADN. En los mutantes *i* no inducibles (que se comportan como dominantes sobre $i^+$), el represor es incapaz de unirse a la lactosa, por lo que la expresión del operón no puede ser inducida.

El modelo concuerda elegantemente con los resultados de los experimentos genéticos de los que se deriva. En las células $i^-$ el represor no es sintetizado, por lo que el operón *lac* se expresa de forma constitutiva. Las células diploides $i^+/i^-$ son inducibles de forma normal, dado que el alelo $i^+$ codifica el represor normal. Finalmente, en mutantes $o^c$ el operador se ha perdido y el

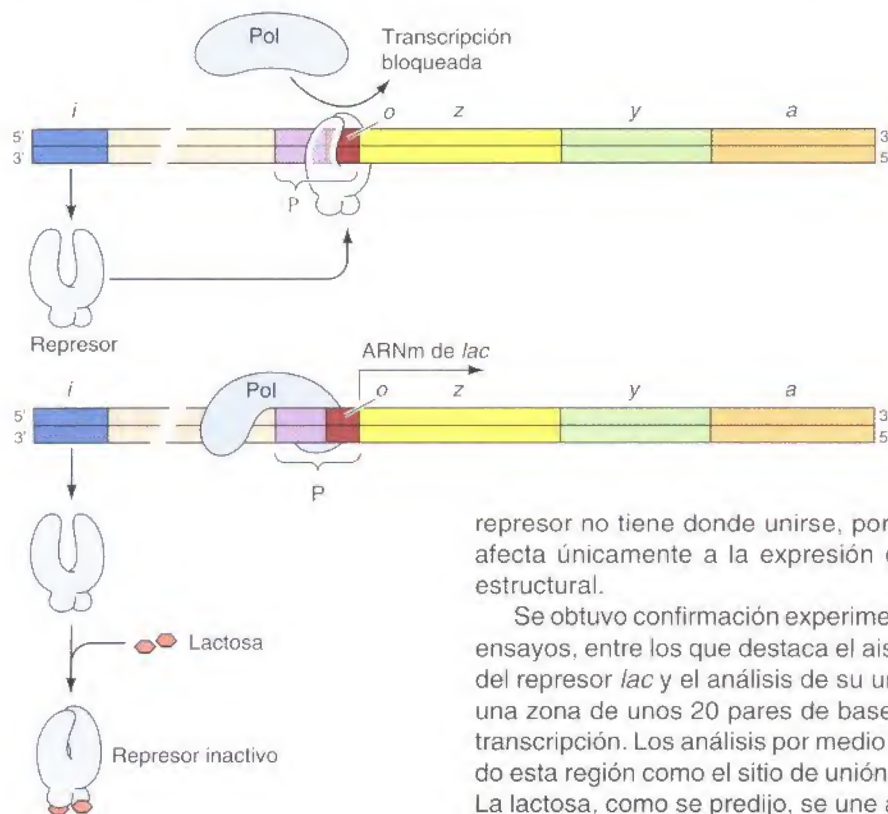



*Figura 6.9*
**Control negativo del operón *lac*.** El gen *i* codifica un represor que, en ausencia de lactosa (arriba), se une al operador (*o*) y bloquea la transcripción de los tres genes estructurales (*z*, β-galactosidasa; *y*, permeasa; y *a*, transacetilasa). La presencia de lactosa induce la expresión del operón mediante la unión al represor (abajo), que evita que este represor se una al operador.
P = promotor; Pol = polimerasa.

represor no tiene donde unirse, por lo que $o^c$ funciona como dominante pero afecta únicamente a la expresión de genes a los que está unido de forma estructural.

Se obtuvo confirmación experimental de este modelo a partir de una serie de ensayos, entre los que destaca el aislamiento en los años 60 por Walter Gilbert del represor *lac* y el análisis de su unión al operador en el ADN, definido como una zona de unos 20 pares de bases situada poco antes del sitio de inicio de transcripción. Los análisis por medio de la técnica del *footprinting* han identificado esta región como el sitio de unión del represor, que bloquea la transcripción. La lactosa, como se predijo, se une al represor, lo cual evita su acción sobre el operador. Las mutaciones $o^c$ producen alteraciones en la secuencia del operador que impiden la unión del represor, lo cual a su vez da lugar a una expresión génica continua o constitutiva.

El principio central de regulación génica ejemplificado por el operón lactosa es que el control de la transcripción está mediado por la interacción de proteínas reguladoras con secuencias de ADN específicas. Este modo de regulación es aplicable de forma general a células procariotas y eucariotas. Las secuencias reguladoras del tipo del operador se denominan **elementos de control de acción en *cis***, dado que afectan únicamente a la expresión de genes presentes en la misma molécula de ADN. Por otro lado, las proteínas del tipo del represor se denominan **factores de acción en *trans***, dado que intervienen en la expresión de genes localizados en otros cromosomas de la célula. El operón *lac* es un ejemplo de control negativo porque la unión del represor bloquea la transcripción. Sin embargo no siempre ocurre así; muchos factores que activan en *trans* son activadores de la transcripción.

## *Control positivo de la transcripción*

El ejemplo mejor estudiado de control positivo en *E.coli* es el efecto de la glucosa en la expresión de genes que codifican las enzimas implicadas en el catabolismo de otros azúcares (incluyendo a la lactosa) utilizados como fuente alternativa de carbono y energía. La glucosa se utiliza de forma preferencial, por lo que mientras está disponible, no se expresan las enzimas implicadas en el catabolismo de fuentes alternativas de energía. Por ejemplo, si se cultiva *E.coli* en un medio que contenga glucosa y lactosa, el operón *lac* no se induce y la bacteria solamente utiliza glucosa. Por lo tanto, la glucosa reprime el operón *lac* incluso en presencia del inductor normal (lactosa).

Actualmente se sabe que la represión por glucosa (denominada represión catabólica o represión por catabolito) está mediada por un sistema de control positivo que depende de los niveles de AMP cíclico (AMPc) (Fig. 6.10). La enzima adenilato ciclasa, que transforma ATP a AMPc, está regulada en bac-

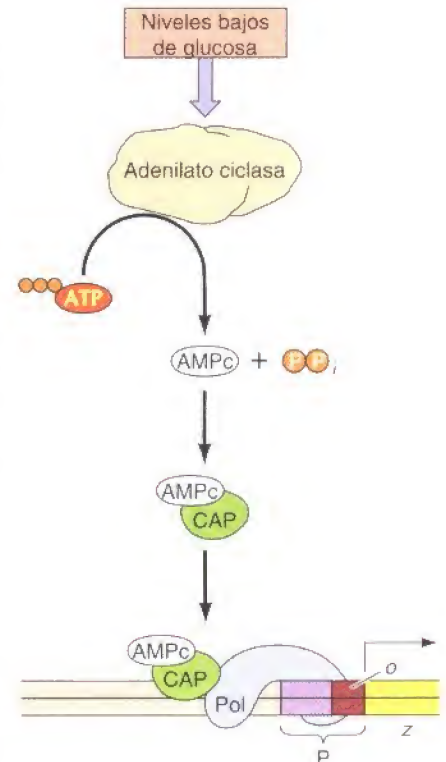



*Figura 6.10*
**Control positivo del operón *lac* por la glucosa.** Los niveles bajos de glucosa activan la adenilato ciclasa, que transforma el ATP en AMP cíclico (AMPc). El AMP cíclico se une después a la proteína activadora del catabolismo (CAP) y favorece su unión a las secuencias reguladoras de distintos operones relacionados con el metabolismo de azúcares alternativos, como la lactosa. La CAP interacciona con la subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa para activar la transcripción.

terias de tal forma que al descender los niveles de glucosa se activa y aumentan los niveles de AMPc. El AMPc se une a una proteína de regulación transcripcional denominada proteína activadora de genes catabólicos (CAP), lo cual promueve la unión de CAP a una determinada secuencia de ADN, que en el operón *lac* está situada aproximadamente 60 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente CAP interacciona con la subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa, facilitando la unión de la polimerasa al promotor y activando la transcripción.

## ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales

Pese a que la transcripción se lleva a cabo siguiendo una serie de mecanismos comunes en todas las células, es considerablemente más complejo en células eucarióticas que en bacterias. Esto se refleja en dos diferencias entre los sistemas procariótico y eucariótico. Primero, mientras que en bacterias todos los genes se transcriben por medio de una ARN polimerasa única, las células eucarióticas contienen varias ARN polimerasas distintas que transcriben distintas clases de genes. En segundo lugar, las ARN polimerasas eucarióticas interaccionan con un conjunto de proteínas específicas para iniciar la transcripción, en vez de unirse directamente a las secuencias promotoras. La mayor complejidad de la transcripción eucariótica posibilita la sutileza en la regulación de la expresión génica necesaria para dirigir las actividades de los distintos tipos celulares en organismos multicelulares.

### *ARN polimerasas eucarióticas*

Las células eucarióticas contienen tres tipos de ARN polimerasas nucleares que transcriben distintos tipos de genes (Tabla 6.1). Los genes codificadores de proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II para dar ARNm; Los ARNs ribosómicos (ARNr) y de transferencia (ARNt) se obtienen por medio de las ARN polimerasas I y III. La ARN polimerasa I está específicamente dirigida a la transcripción de las tres moléculas de mayor tamaño de ARNr, designadas 28S, 18S y 5,8S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación durante la centrifugación. La ARN polimerasa III transcribe los genes codificantes de los ARNt y de las especies más pequeñas de ARNr (5S). Algunos de los ARNs pequeños implicados en el empalme y en el transporte de proteínas (ARNsn y ARNsc) también son transcritos por la ARN polimerasa III, mientras que otros son productos de la ARN polimerasa II. Adicionalmente existen ARN polimerasas distintas (similares a las ARN polimerasas bacterianas) en el interior de los cloroplastos y las mitocondrias, donde transcriben de forma específica el ADN de estas organelas.

Las tres ARN polimerasas nucleares son enzimas complejas, que se componen de 8 a 14 subunidades cada una. Pese a que reconocen distintos promotores y transcriben distintas clases de genes, comparten muchas características comunes entre ellas, además de con la ARN polimerasa bacteriana. En concreto, las tres ARN polimerasas eucarióticas contienen nueve subunidades, conservadas, cinco de las cuales están relacionadas con las subunidades $\alpha$, $\beta$, $\beta'$ y $\omega$ de la ARN polimerasa bacteriana. La reciente determinación de la estructura de la ARN polimerasa II de levaduras mediante cristalografía de rayos X ha

**TABLA 6.1.** Tipos de genes transcritos por ARN polimerasas eucarióticas

| Tipos de ARN sintetizados | ARN polimerasa |
|---|---|
| Genes nucleares | |
| ARNm | II |
| ARNt | III |
| ARNr | |
| 5,8S, 18S, 28S | I |
| 5S | III |
| ARNsn y ARNsc | II y III[a] |
| Genes mitocondriales | Mitocondriales[b] |
| Genes cloroplásticos | Cloroplásticos[b] |

[a] Algunos ARNs nucleares pequeños (sn) y citoplásmicos (sc) se transcriben por la polimerasa II y otros por la polimerasa III.
[b] Las ARN polimerasas mitocondriales y de cloroplastos son similares a las enzimas bacterianas.



*Figura 6.11*
**Estructura de la ARN polimerasa II de levaduras.** Las subunidades individuales se diferencian por colores. (De P. D. Kramer et al, 2001. *Science* 292:1863.)

revelado que la arquitectura de esta ARN polimerasa eucariótica es muy similar a la de la enzima bacteriana (Figura 6.11), sugiriendo que todas las ARN polimerasas emplean mecanismos fundamentalmente conservados para transcribir el ADN.

## Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II

Dado que la ARN polimerasa II es responsable de la síntesis de ARNm a partir de los genes codificantes de proteínas, ha sido el objetivo de la mayoría de los estudios de transcripción en eucariotas. Los estudios iniciales de esta enzima indicaron que su funcionamiento es diferente de la ARN polimerasa procariótica. En sistemas eucarióticos no es posible obtener la transcripción fidedigna de genes bacterianos conseguida *in vitro* con la simple adición de ARN polimerasa purificada a un ADN portador de un promotor. El fundamento de esta diferencia fue elucidado en 1979, cuando Robert Roeder y sus colaboradores descubrieron que la ARN polimerasa II solo es capaz de iniciar la transcripción si se añaden proteínas adicionales a la reacción. Por lo tanto, la transcripción en sistemas eucarióticos precisa de distintos factores de iniciación que (en contraste con la subunidad $\sigma$) no forman parte de la polimerasa.

El fraccionamiento bioquímico de extractos nucleares ha llevado a la identificación de proteínas específicas (denominadas **factores de transcripción**) que son necesarias para que la ARN polimerasa II inicie la transcripción. De hecho, la identificación y caracterización de estos factores representa una buena parte de los esfuerzos en curso para entender la transcripción en células eucarióticas. Han sido definidos dos tipos de factores de transcripción. Los **factores de transcripción generales** están implicados en la transcripción en todos los promotores de la polimerasa II y se consideran entonces parte de la maquinaria transcripcional básica. Otros factores transcripcionales (discutidos más adelante en el capítulo) se unen a secuencias de ADN que controlan la expresión de genes individuales y son por lo tanto responsables de regular la expresión génica. Se estima que aproximadamente el 5% de los genes del genoma humano codifica factores de transcripción, lo que resalta la importancia de estas proteínas.

Se requieren cinco factores de transcripción generales para iniciar la transcripción por la ARN polimerasa II en sistemas reconstituidos *in vitro* (Fig. 6.12). Los promotores de muchos genes transcritos por la ARN polimerasa II contienen una secuencia similar a TATAA a unos 25-30 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Esta secuencia (denominada **secuencia TATA o**

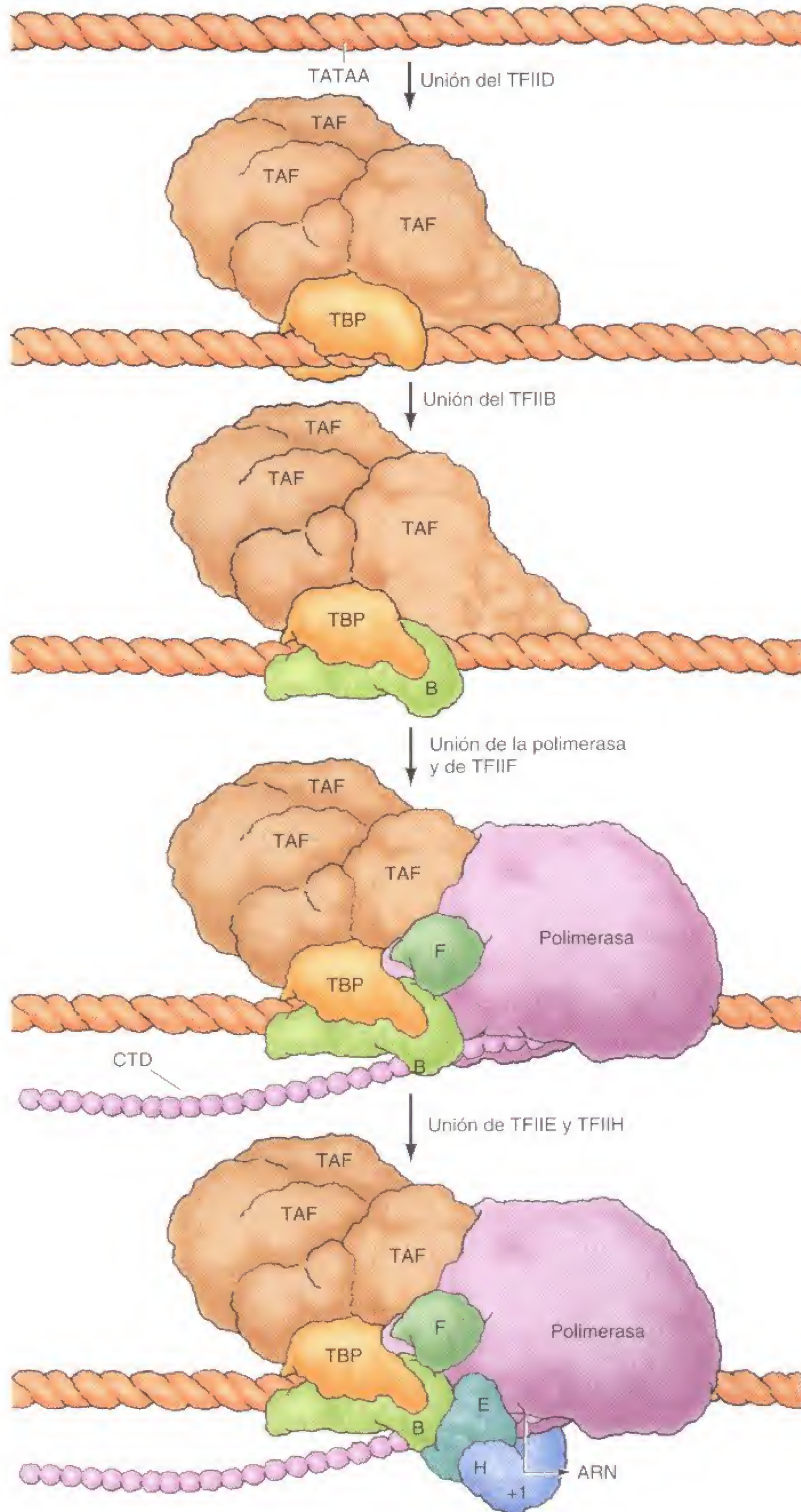



*Figura 6.12*
**Formación de un complejo de transcripción de la polimerasa II.** Muchos promotores de la polimerasa II tienen una caja TATA (secuencia consenso TATAA) unos 25 o 30 nucleótidos corriente arriba del punto de inicio de transcripción. Esta secuencia es reconocida por el factor de transcripción TFIID, que consta de una proteína de unión a TATA (TBP) y factores asociados al TBP (TAFs). El TFIID(B) se une al TBP, y a continuación se une la polimerasa, asociada al TFIIF(F). Por último, se añaden al complejo el TFIIE(E) y el TFIIH(H).

**TATA *box***) se parece a la secuencia −10 de los promotores bacterianos, y los resultados de la introducción de mutaciones en las secuencias TATAA han demostrado su papel en la iniciación de la transcripción. El primer paso en la formación del complejo transcripcional es la unión de un factor general de transcripción llamado TFIID a la secuencia TATA (TF de *f*actor de *t*ranscripción; II de polimerasa II). El TFIID se compone a su vez de múltiples subunidades, incluyendo a la **proteína de unión a TATA** (**TBP**), que se une de forma específica a la secuencia consenso TATAA, y otros 10-12 polipéptidos, denominados **factores asociados a TBP** (**TAF**). La TBP se une entonces a un segundo factor de transcripción general (TFIIB) formando un complejo TBP-TFIIB en el promotor (Fig. 6.13). El TFIIB a su vez sirve de puente para la ARN polimerasa, que se une al complejo TBP-TFIIB en asociación con un tercer factor, TFIIF.

Tras el reclutamiento de la ARN polimerasa II por el promotor, se precisa de la unión de otros dos factores adicionales (TFIIE y TFIIH) para iniciar la transcripción. El TFIIH es un factor con múltiples subunidades que parece tener al menos dos importantes funciones. En primer lugar dos de las subunidades de TFIIH son helicasas, que desenrollan el ADN alrededor del sitio de iniciación (estas subunidades de TFIIH son también necesarias para la escisión y reparación de nucleótidos, como fue expuesto en el Cap. 5). Otra subunidad de la TFIIH es una proteína quinasa que fosforila determinadas secuencias repetidas en el dominio C-terminal de la subunidad principal de la ARN polimerasa II. El dominio C-terminal de la polimerasa II (o CTD) consiste en repeticiones en tándem (27 repeticiones en levaduras y 52 en el hombre) de 7 aminoácidos con la secuencia consenso

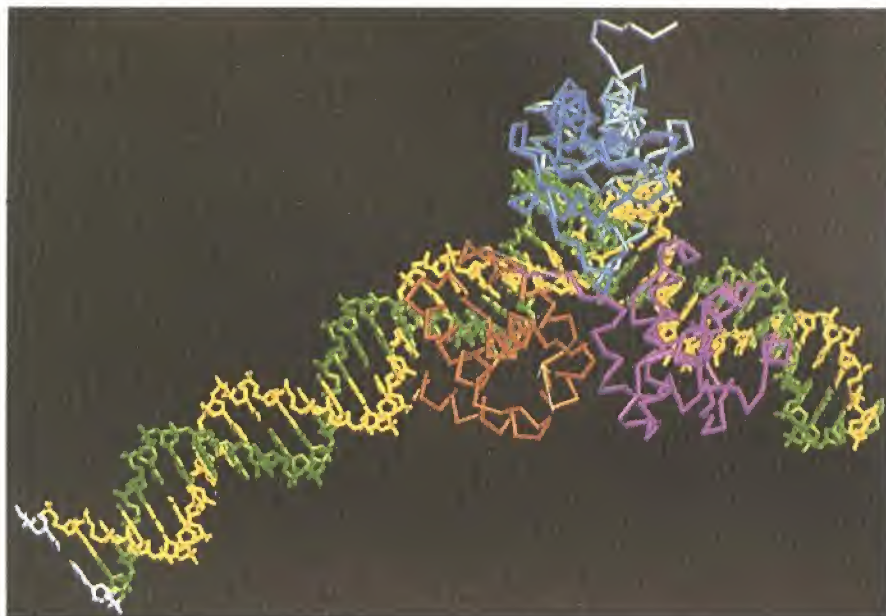


*Figura 6.13*
**Modelo de complejo TBP-TFIIB unido al ADN.** Se muestra el ADN como una estructura recta constituida por líneas amarillas y verdes, con el punto de inicio de transcripción denominado +1. La TBP consta de dos repeticiones, de color azul claro y azul oscuro. El TFIIB está representado en color naranja y magenta. Es importante resaltar que la unión de la TBP dobla o pliega al ADN con un ángulo de unos 110° aproximadamente (cortesía de D. B. Nikolov y cols., 1995. Nature 377:119).

Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. La fosforilación de estos aminoácidos libera a la polimerasa de su asociación con el complejo de preiniciación, y da lugar al reclutamiento de otras proteínas que permiten que la polimerasa inicie la transcripción y comience la síntesis de una creciente molécula de ARNm.

Además de una caja TATA, los promotores de muchos genes transcritos por la ARN polimerasa II contienen, además de la secuencia TATA, una segunda secuencia de interés (una secuencia iniciadora, o Inr) que amplía el sitio de iniciación de la transcripción. Algunos promotores de la ARN polimerasa II contienen únicamente la secuencia Inr, no existiendo secuencia TATA. Muchos promotores que carecen de secuencia TATA pero que contienen un elemento Inr también contienen un elemento promotor adicional (DPE: *downstream promoter element*), localizado aproximadamente 30 pares de bases después del sitio de iniciación de la transcripción, que funciona cooperativamente con la secuencia Inr. La iniciación en estos promotores sigue precisando de TFIID (y TBP) pese a que evidentemente el TBP no reconoce a los promotores por su unión a la secuencia TATA. En lugar de ello, otras subunidades de TFIID (TAFs) se unen a las secuencias Inr y DPE, lo cual atrae al TBP al promotor. Después el TFIIB, la polimerasa II y el resto de factores de transcripción adicionales se unen de la forma ya descrita. Por lo tanto, el TBP desempeña un papel central en la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II incluso en promotores que carecen de la secuencia TATA.

Aunque el reclutamiento secuencial de cinco factores de transcripción generales y la ARN polimerasa II descritos aquí representan el sistema mínimo necesario para la transcripción *in vitro*, en el interior celular se requieren factores adicionales. Estos factores incluyen el complejo proteico **Mediador** que permite que la polimerasa responda a los factores de transcripción gen-específicos que regulan la expresión génica. Al menos una fracción de ARN polimerasa II, tanto en levaduras como en células de mamífero, está presente en forma de grandes complejos (denominados holoenzimas de ARN polimerasa II) en los que la polimerasa está asociada con las proteínas Mediadoras, además de con un subgrupo de factores de transcripción generales, incluyendo TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH. Las proteínas Mediadoras están asociadas con el dominio C-terminal de la polimerasa II, y se liberan de la polimerasa tras el ensamblaje del complejo de preiniciación y la fosforilación del dominio C-terminal de la polimerasa (Fig. 6.14). El CTD fosforilado a continuación se une a otras proteínas que facilitan la elongación transcripcional y funcionan en el procesamiento del ARNm, estudiado más adelante en este capítulo.

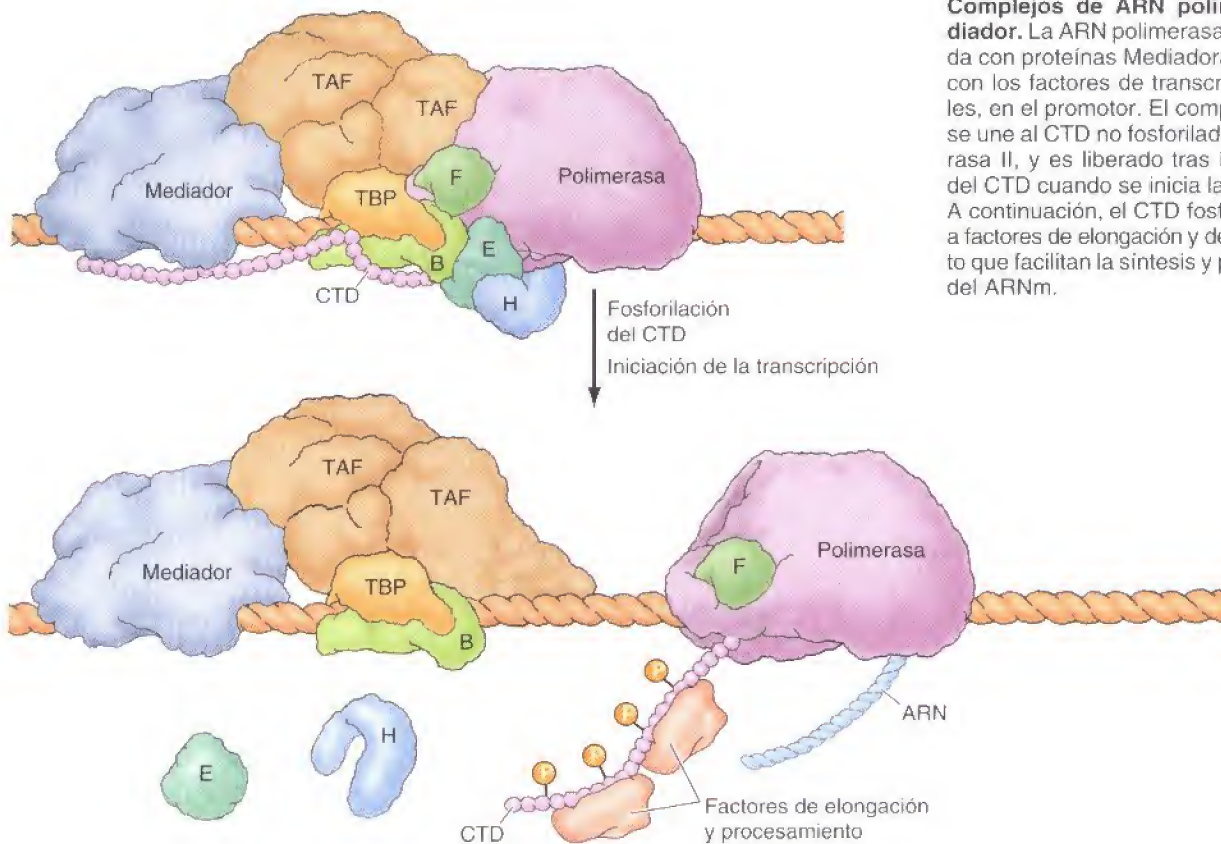



*Figura 6.14*
**Complejos de ARN polimerasa II/Mediador.** La ARN polimerasa II está asociada con proteínas Mediadoras, además de con los factores de transcripción generales, en el promotor. El complejo Mediador se une al CTD no fosforilado de la polimerasa II, y es liberado tras la fosforilación del CTD cuando se inicia la transcripción. A continuación, el CTD fosforilado se une a factores de elongación y de procesamiento que facilitan la síntesis y procesamiento del ARNm.

## *Transcripción por las ARN polimerasas I y III*

Como fue expuesto con anterioridad, la transcripción de los genes que codifican los ARNs ribosómicos y de transferencia eucarióticos es llevada a cabo por otros tipos de ARN polimerasas. Las tres clases de ARN polimerasas requieren factores de transcripción adicionales para asociarse a los promotores adecuados. Sin embargo, pese a que las tres polimerasas reconocen distintos tipos de promotores, se requiere un factor de transcripción común —la proteína de unión a TATA (TBP)— para iniciar la transcripción por parte de cualquiera de las tres enzimas.

La ARN polimerasa I se dedica de forma exclusiva a la transcripción de genes de ARN ribosómico, que están presentes en forma de repeticiones en tándem. La transcripción de estos genes da lugar a un pre-ARNr 45S de gran tamaño, que es procesado para dar los ARNrs 28S, 18S y 5,8S (Fig. 6.15). El promotor de los genes de ARN ribosómico se extiende unos 150 pares de basas corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias pro-

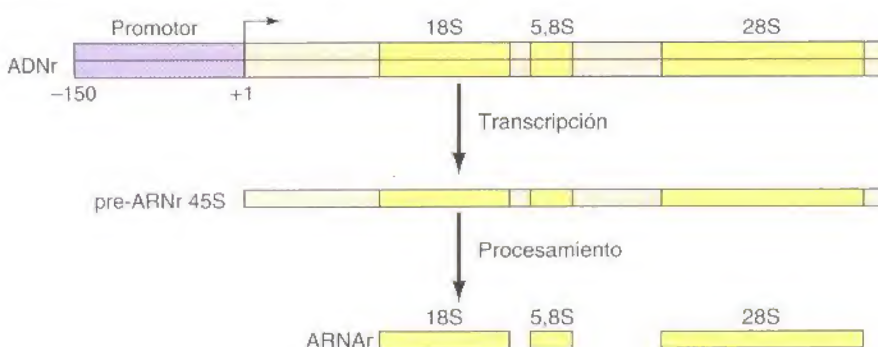



*Figura 6.15*
**Gen de ARN ribosómico.** El ADN ribosómico (ADNr) se transcribe para dar lugar a una molécula de ARN de gran tamaño (pre-ARNAr 45S) que posteriormente es dividida en ARNr de 28S, 18S y 5,8S.

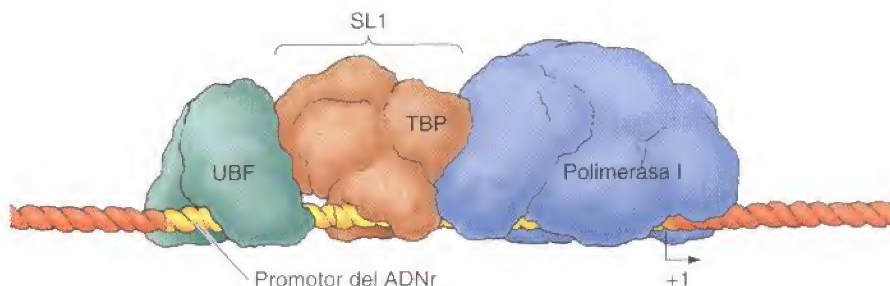



*Figura 6.16*
**Iniciación de la transcripción del ADNr.** Dos factores de transcripción, el UBF y el SL1, se unen conjuntamente al promotor del ADNr y reclutan a la ARN polimerasa I para formar el complejo de iniciación. Una subunidad del SL1 es la proteína de unión a TATA (TBP).

motoras son reconocidas por dos factores de transcripción, el UBF (factor de unión corriente-arriba) y el SL1 (factor de selectividad 1), que se unen de forma cooperativa al promotor y posteriormente reclutan a la polimerasa I para formar el complejo de iniciación (Fig. 6.16). El factor de transcripción SL1 se compone de cuatro subunidades proteínicas, una de las cuales, sorprendentemente, es la TBP. El papel de la TBP ha sido demostrado directamente con el descubrimiento de que las levaduras portadoras de mutaciones en la TBP son defectivas no solo para la transcripción por la polimerasa II, sino también por las polimerasas I y III. Por lo tanto, la TBP es un factor transcripcional común a los tres tipos de ARN polimerasas eucarióticas. Dado que el promotor de los genes de ARN ribosómico no contiene una secuencia TATA, la TBP no se une a secuencias promotoras específicas. En lugar de ello, la asociación de la TBP con los genes de ARN ribosómico está mediada por la unión de otras proteínas en el complejo SL1 al promotor, un mecanismo similar a la asociación de la TBP con las secuencias Inr de los genes de la polimerasa II que carecen de secuencias TATA.

Los genes del ARNt, ARN 5S y algunos de los ARNs pequeños implicados en el corte y empalme y en el transporte de proteinas se transcriben por medio de la ARN polimerasa III. Estos genes se transcriben a partir de tres clases de promotores diferentes, dos de los cuales se encuentran en el interior, en lugar de por delante, de la secuencia transcrita (Fig. 6.17). De los genes transcritos por la ARN polimerasa III los estudiados con mayor profundidad son los del ARNr 5S de *Xenopus*. El TFIIIA (que ha sido el primer factor de transcripción purificado) inicia el ensamblaje del complejo de transcripción uniéndose a secuencias específicas de ADN en el promotor del gen del ARNr 5S. Esta unión se sigue de la unión secuencial de TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores de los genes del ARNt se diferencian del promotor del ARNr 5S en que no contienen la secuencia de ADN reconocida por el TFIIIA. En lugar de ello, el TFIIIC se une directamente a los promotores de los genes del ARNt, y atrae al TFIIIB y la polimerasa para formar un complejo de transcripción. Los promotores de la tercera clase de genes transcritos por la polimerasa III, incluyendo los genes que codifican algunos de los ARNs pequeños nucleares implicados en el corte y empalme, se localizan por delante del punto de iniciación de la transcripción. Estos promotores contienen una secuencia TATA (como los promotores de los genes de la polimerasa II) además de un punto de unión para otro factor, denominado SNAP. SNAP y TFIIIB se unen cooperativamente a estos promotores, y TFIIIB se une directamente a la secuencia TATA. Esto está mediado por una proteína de unión a TATA, TBP, que es una de las subunidades de TFIIIB. Al igual que en el caso de los promotores de otros genes de la ARN polimerasa III, a continuación TFIIIB recluta a la polimerasa al complejo transcripcional.

## Regulación de la transcripción en eucariotas

Pese a que el control de la expresión génica es mucho más complejo en eucariotas que en bacterias, se aplican los mismos principios básicos. La expresión de los genes eucarióticos está controlada principalmente a nivel de iniciación de la transcripción, aunque en muchos casos la transcripción también está regulada durante la elongación. Al igual que ocurre en bacterias, la transcripción en

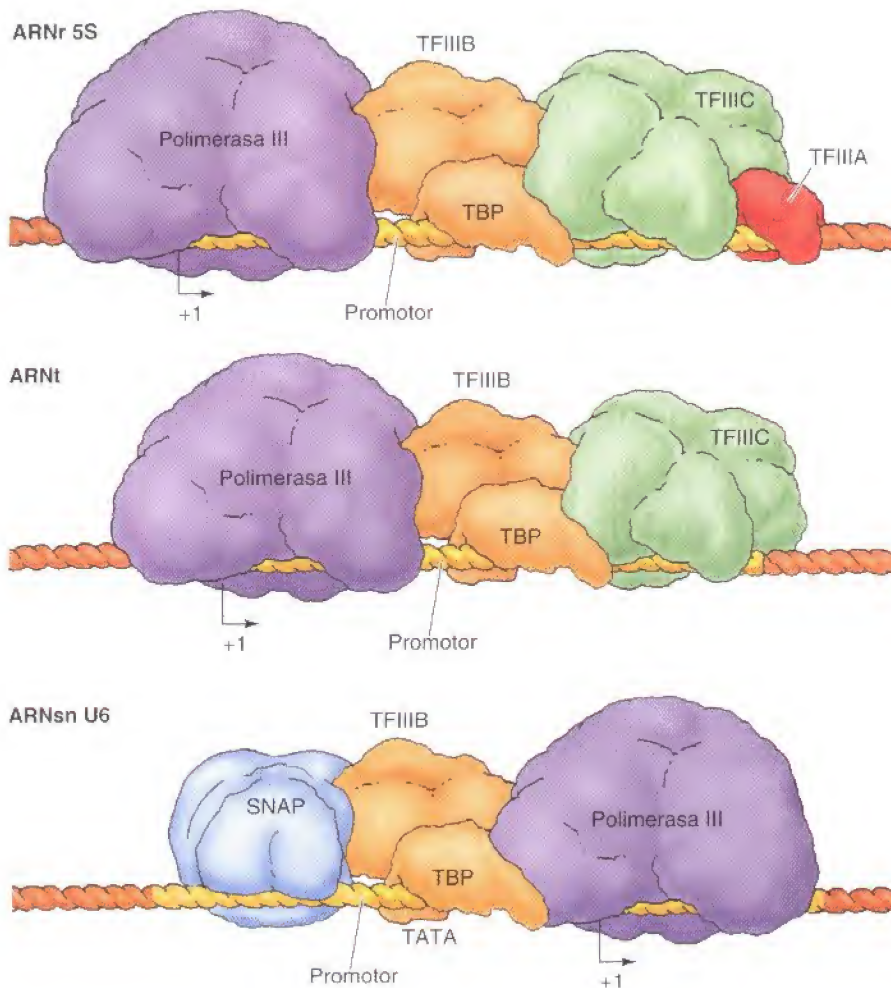



*Figura 6.17*
**Transcripción de los genes de la polimerasa III.** Los genes transcritos por la polimerasa III se expresan a partir de tres tipos de promotores. Los promotores de los genes del ARNr 5S y ARNt están corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción. La transcripción del gen de ARNr 5S comienza con la unión de TFIIIA, seguido del TFIIIC, TFIIIB y la polimerasa. Los promotores del ARNt no tienen un sitio de unión para el TFIIIA, ya que éste no es necesario para la transcripción. En su lugar, es el TFIIIC el que inicia la transcripción de los genes de los ARNt gracias a su unión a las secuencias promotoras, y posteriormente a la asociación de TFIIIB y la polimerasa. El promotor del gen del ARNsn U6 está corriente arriba del punto de iniciación de la transcripción y contiene una secuencia TATA, que es reconocida por la subunidad de la proteína de unión a TATA (TBP) del TFIIIB, en cooperación con otro factor denominado SNAP.

las células eucariotas está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras específicas y modulan la actividad de la ARN polimerasa. Una diferencia importante entre la regulación transcripcional en procariotas y eucariotas, sin embargo, resulta del empaquetamiento del ADN eucariótico en cromatina, lo que limita su disponibilidad como molde para la transcripción. Como resultado, las modificaciones de la estructura de la cromatina juegan papeles fundamentales en el control de la transcripción en células eucariotas.

## *Secuencias de regulación en cis: promotores y estimuladores*

La transcripción en bacterias se regula por la unión de proteínas a secuencias de acción en *cis* (p. ej., el operón lac) que controlas la transcripción de genes adyacentes. Secuencias de acción en *cis* similares regulan la transcripción de genes eucariotas. Estas secuencias han sido identificadas en células de mamífero por medio de la utilización de ensayos de transferencia génica con el fin de estudiar la actividad de regiones sugerentes de poseer función reguladora en genes clonados (Fig. 6.18). Las secuencias de regulación eucarióticas se unen a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable. La expresión del gen reportero tras su transferencia a células en cultivo proporciona un ensayo sensible para determinar la actividad de las secuencias reguladoras en la dirección de la transcripción. Es posible identificar regiones reguladoras biológicamente activas, y se puede utilizar la mutagénesis *in vitro* para determinar la función de secuencias específicas.

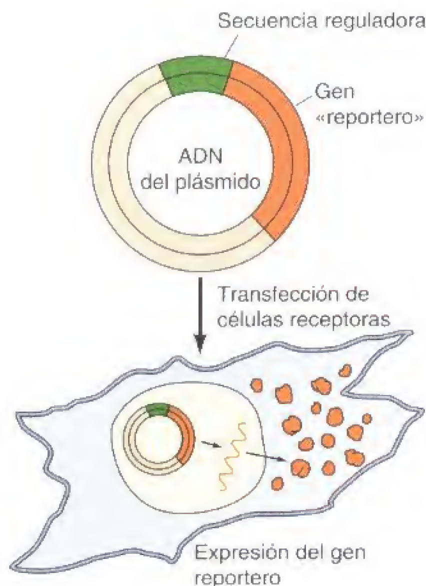



*Figura 6.18*
**Identificación de las secuencias reguladoras eucarióticas.** Se une la secuencia reguladora de un gen eucariótico clonado a un gen «reportero» que codifica una enzima fácilmente detectable. El plásmido resultante se introduce en células receptoras cultivadas mediante transfección. Una secuencia reguladora activa dirige la transcripción del gen reportero, y su expresión es detectada en las células transfectadas.

Los genes transcritos por la ARN polimerasa II tienen dos elementos promotores principales, las secuencias TATA e Inr, que sirven de sitios de unión específicos para factores de transcripción generales. Otras secuencias de acción en *cis* sirven de sitios de unión para una amplia variedad de factores de regulación que controlan la expresión de genes individuales. Estas secuencias reguladoras en *cis* se localizan de forma frecuente, pero no constante, corriente arriba de la secuencia TATA. Por ejemplo, dos secuencias de regulación que se encuentran en muchos genes eucarióticos fueron identificadas en estudios del promotor del gen que codifica a la timidina quinasa en el virus del herpes simple (Fig. 6.19). Ambas secuencias se localizan a 100 pares de bases corriente arriba de la secuencia TATA: sus secuencias consenso son CCAAT y GGGCGG (llamada secuencia GC, o GC *box*). Actualmente han sido identificadas proteínas específicas que se unen a estas secuencias y estimulan la transcripción.

En contraste con la relativamente simple organización de las secuencias CCAAT y GC en el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes, muchos genes de células eucarióticas están controlados por secuencias de regulación localizadas a mayor distancia ( en ocasiones a más de 10 kilobases) del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias, denominadas **estimuladores** o ***enhancers***, fueron identificadas por primera vez por Walter Schaffner en 1981 en estudios del promotor de otro virus, el SV40 (Fig. 6.20). Además de una secuencia TATA y un conjunto de seis secuencias GC, para llevar a cabo una transcripción eficiente se requieren dos repeticiones de 72 pares de bases localizadas más lejos corriente arriba. Se observó que estas secuencias estimulan la transcripción de otros promotores además del promotor del SV40, y, sorprendentemente, su actividad no depende ni de la distancia ni de su orientación respecto al sitio de inicio de la transcripción (Fig. 6.21). Pueden estimular la transcripción situados corriente arriba o abajo del promotor y orientados en cualquiera de los dos sentidos.

La capacidad de los estimuladores de funcionar incluso a distancia de los sitios de iniciación de la transcripción sugirió inicialmente que actúan por un mecanismo distinto al resto de los promotores. Sin embargo esto no ha resultado ser cierto: los intensificadores, como los promotores, actúan ligando factores transcripcionales que regulan posteriormente a la ARN polimerasa. Esto es posible porque el ADN forma bucles, que permiten que un factor de transcripción unido a un intensificador lejano interactúe con la ARN polimerasa o con un factor de transcripción general en el promotor (Fig. 6.22). Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden por lo tanto actuar por el mismo mecanismo que los situados adyacentes a los promotores, por lo que no existe ninguna diferencia fundamental entre las acciones de los intensificadores y las de las secuencias reguladoras en *cis* adyacentes a los sitios de inicio de la

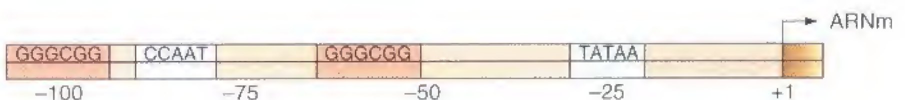



*Figura 6.19*
**Promotor eucariótico.** El promotor del gen de la timidina quinasa del virus del *herpes simplex* contiene tres secuencias corriente arriba de la secuencia TATA, necesarias para una transcripción eficaz: una secuencia CCAAT y dos secuencias GC (secuencia consenso GGGCGG).

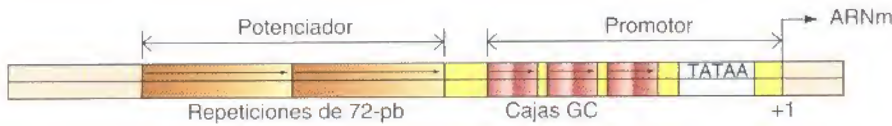



*Figura 6.20*
**Estimulador del SV40.** El promotor del SV40 para la expresión génica precoz contiene una secuencia TTA y seis secuencias GC organizadas en tres grupos de secuencias repetidas. Además, para una transcripción eficaz se necesita un potenciador situado hacia arriba en la cadena que consta de dos repeticiones de 72 pares de bases (pb).

transcripción. Es interesante reseñar que aunque los *enhancers* fueron inicialmente identificados en eucariotas, han sido posteriormente encontrados en bacterias —un caso inusual de aplicación de estudios en eucariotas como modelo para sistemas procarióticos—.

La unión de proteínas de regulación transcripcional específicas a los estimuladores es responsable del control de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación, así como en la respuesta celular a hormonas y factores de crecimiento. Uno de los estimuladores eucarióticos estudiado con mayor detalle controla la transcripción de genes de inmunoglobulinas en linfocitos B. Los experimentos de transferencia génica han establecido que el estimulador de las inmunoglobulinas es activo en linfocitos, pero no en otros tipos celulares. Por lo tanto, esta secuencia reguladora es al menos en parte responsable de la especificidad tisular en la expresión de los genes de inmunoglobulinas en el tipo celular apropiado.

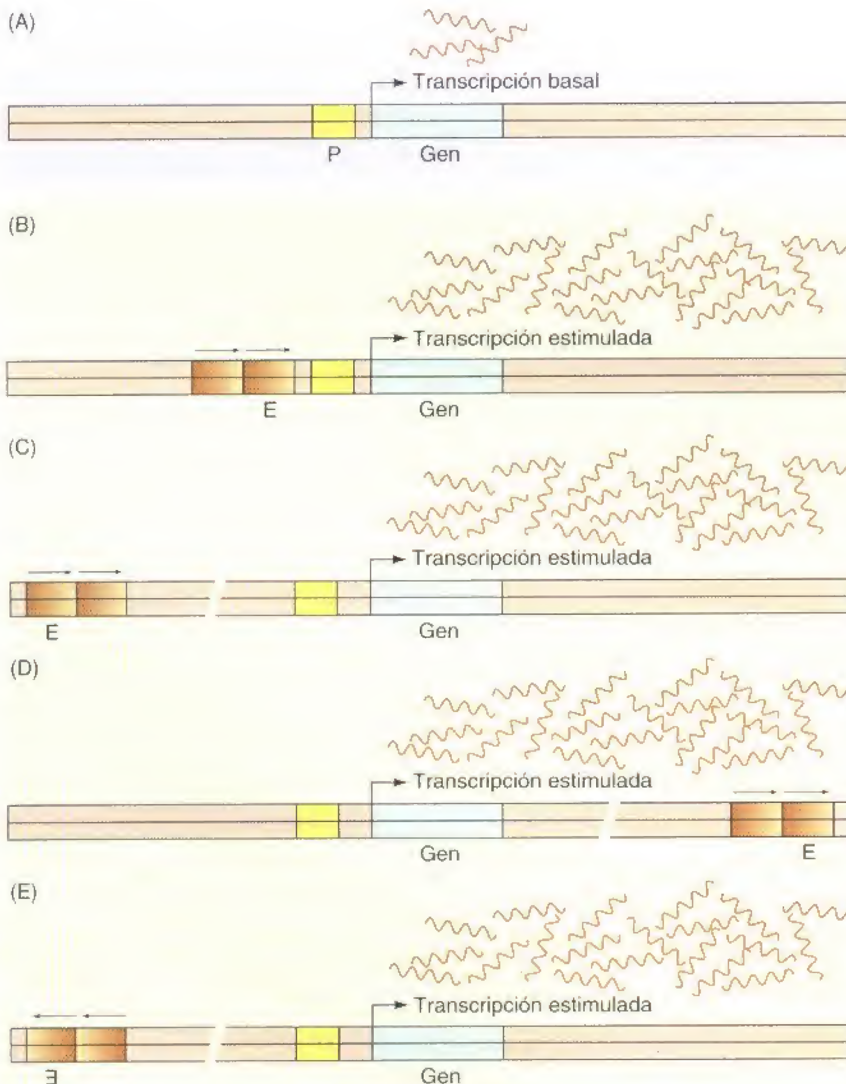



*Figura 6.21*
**Actuación de los estimuladores.** Sin un estimulador, el gen se transcribe a un nivel basal bajo (A). La adición de un estimulador, E —por ejemplo, las repeticiones de 72 pares de bases del SV40— estimula la transcripción. El estimulador es activo no sólo cuando se coloca en la cadena justo por delante del promotor (B), sino también a varias kilobases hacia arriba o hacia abajo del sitio de inicio de transcripción (C y D). Además, los estimuladores son activos orientados en cualquiera de los dos sentidos (E).

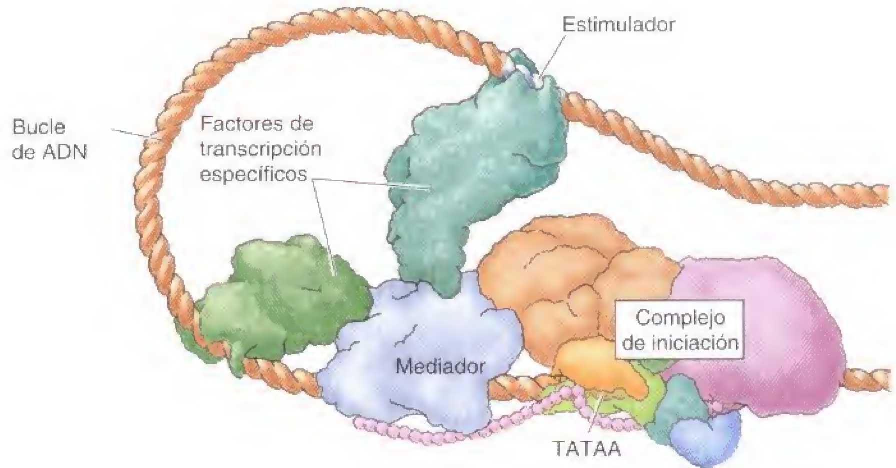



*Figura 6.22*
**Formación de bucles en el ADN.** Los factores de transcripción unidos a estimuladores lejanos pueden interaccionar con el complejo ARN polimerasa II/mediador o los factores de transcripción generales en el promotor gracias a que el ADN es capaz de formar bucles. Por este motivo no existe una diferencia fundamental entre la acción de factores de transcripción unidos al ADN justo por delante del promotor y aquellos estimuladores lejanos.

Una característica importante de los estimuladores es que habitualmente contienen múltiples secuencias funcionales que ligan diferentes proteínas de regulación transcripcional. Estas proteínas funcionan de forma conjunta en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, el estimulador de las cadenas pesadas de inmunoglobulina abarca unos 200 pares de bases y contiene al menos nueve secuencias distintas que sirven de sitio de unión a proteínas (Fig. 6.23). Una mutación en cualquiera de estas secuencias reduce pero no elimina la actividad intensificadora, indicando que las funciones de las proteínas individuales que se unen al intensificador son, al menos en parte, redundantes. Muchas de las secuencias individuales del intensificador de las inmunoglobulinas estimulan por sí mismas la transcripción en células no linfoides. Por lo tanto la actividad restringida del intensificador intacto en linfocitos B no se debe a que cada uno de sus componentes posea especificidad tisular. La especificidad tisular en la expresión resulta de la combinación de secuencias individuales que componen el intensificador. Estos elementos incluyen algunas secuencias reguladoras de actuación en *cis* que se unen a activadores de la transcripción que se expresan de forma específica en linfocitos B, así como otras secuencias reguladoras que unen represores en células no linfoides. Por lo tanto, el estimulador de las inmunoglobulinas contiene elementos de regulación negativa que inhiben la transcripción en tipos celulares inapropiados, así como elementos de regulación positiva que activan la transcripción en linfocitos B. La actividad conjunta del estimulador es mayor que la suma de sus partes, reflejando la acción combinada de las proteínas asociadas con cada uno de sus secuencias individuales.

Aunque la formación de bucles de ADN permite que los *enhancers* actúen a una distancia considerable de los promotores, la actividad de cualquier *enhancer* dado es específica para el promotor de su gen diana correspondiente. Esta especificidad se mantiene gracias a los **aisladores** o ***insulators***, que dividen a los cromosomas en dominios independientes e impiden que los *enhancers* actúen sobre promotores localizados en dominios adyacentes. Los aisladores también previenen que se propague la estructura de la cromatina de un dominio




*Figura 6.23*
**Estimulador de la inmunoglobulina.** El estimulador de la cadena pesada de la inmunoglobulina abarca unas 200 bases y contiene nueve secuencias funcionales (E, $\mu$E1-5, $\pi$, $\mu$B y OCT) que conjuntamente estimulan la transcripción en linfocitos B.

a sus vecinos, manteniendo así regiones del genoma reguladas independientemente.

## *Proteínas de regulación transcripcional*

El aislamiento de un conjunto de proteínas de regulación transcripcional se ha basado en su unión específica a secuencias promotoras o estimuladoras. La unión de proteínas a estas secuencias de ADN se analiza habitualmente por dos tipos de experimentos. El primero, la técnica del *footprinting*, ha sido descrito previamente en relación con la unión de la ARN polimerasa a los promotores procarióticos (véase la Fig. 6.3). El segundo abordaje es el **test de cambio de movilidad electroforética**, en el que un fragmento de ADN radiomarcado es incubado con una preparación de proteínas y después es sometido a electroforesis en un gel no desnaturalizante (Fig. 6.24). La unión a proteínas es detectada por un descenso en la movilidad electroforética del fragmento de ADN, dado que su migración se ve enlentecida por la proteína ligada. La utilización combinada de los tests del *footprinting* y del cambio de movilidad electroforética han llevado a correlacionar sitios de unión de proteínas con los elementos reguladores de estimuladores y promotores, indicando que estas secuencias generalmente constituyen los sitios de reconocimiento de proteínas específicas de unión al ADN.

Uno de los prototipos de factores de transcripción eucarióticos fue inicialmente identificado por Robert Tjian y sus colaboradores durante los estudios de la transcripción del ADN del SV40. Este factor (denominado Sp1, proteína de especificidad 1) estimula la transcripción en extractos libres de células a partir del promotor SV40, pero no a partir de otros muchos promotores. Posteriormente se determinó que la estimulación de la transcripción por la Sp1 depende de la presencia de secuencias GC en el promotor SV40: Si estas secuencias son delecionadas se elimina la estimulación por la Sp1. Los experimentos de análisis por la técnica del *footprinting* establecieron que la Sp1 se une de forma específica a las secuencias GC. En conjunto, estos resultados indican que las secuencia GC representa un sitio de unión específico para un activador transcripcional —Sp1—. Experimentos similares han establecido que muchas otras secuencias reguladoras de la transcripción, incluidas la secuencia CCAAT y las múltiples secuencias del estimulador de las inmunoglobulinas, también representan sitios de reconocimiento para proteínas de unión al ADN con especificidad de secuencia (Tabla 6.2).

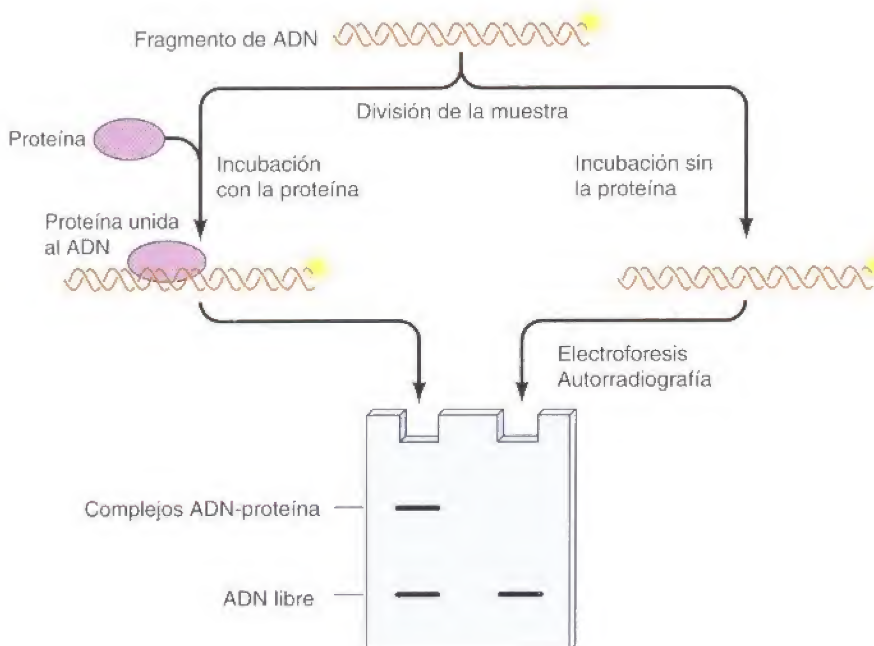



*Figura 6.24*
**Test del cambio en la movilidad electroforética.** Se divide en dos una muestra que contiene fragmentos de DNA marcados radiactivamente, y una de las mitades es incubada con una proteína que se une a una secuencia determinada de ADN. Las muestras son posteriormente analizadas mediante electroforesis en un gel no desnaturalizante, de forma que la proteína permanezca unida al ADN. La unión de la proteína se detecta gracias a la migración más lenta de los complejos ADN-proteína comparada con la del ADN libre. Realmente sólo una parte del ADN en la muestra está unido a la proteína, por lo que tanto los complejos de ADN-proteína como el ADN libre se detectan por la incubación del ADN con la proteína.

**TABLA 6.2.** Ejemplos de factores de transcripción y sus sitios de unión al ADN representativos

| Factor de transcripción | Sitio de unión consenso |
|---|---|
| Proteína de especificidad 1 (Sp1) | GGGCGG |
| CCAAT/Proteína de unión al potenciador (C/EBP) | CCAAT |
| Proteína activadora 1 (AP1) | TGACTCA |
| Proteínas de unión a octámeros (OCT-1 y OCT-2) | ATGCAAAT |
| Proteínas de unión a caja-E (E12, E47, E2-2) | CANNTG[a] |

[a] N puede sustituirse por cualquier nucleótido.

La unión específica de la Sp1 a la secuencia GC no sólo estableció la acción de la Sp1 como un factor de transcripción con especificidad de secuencia; también sugirió un abordaje general para la purificación de factores de transcripción. El aislamiento de estas proteínas supuso inicialmente un formidable reto dado que están presentes en muy pequeñas cantidades (p. ej., únicamente el 0,001 % de las proteínas celulares totales), difíciles de purificar por técnicas bioquímicas convencionales. Este problema fue superado por la **cromatografía de afinidad de ADN** (Fig. 6.25). Múltiples copias de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia GC fueron fijadas a un soporte sólido, y se hicieron pasar extractos celulares a través de la columna de oligonucleótidos. Dado que la Sp1 se une a

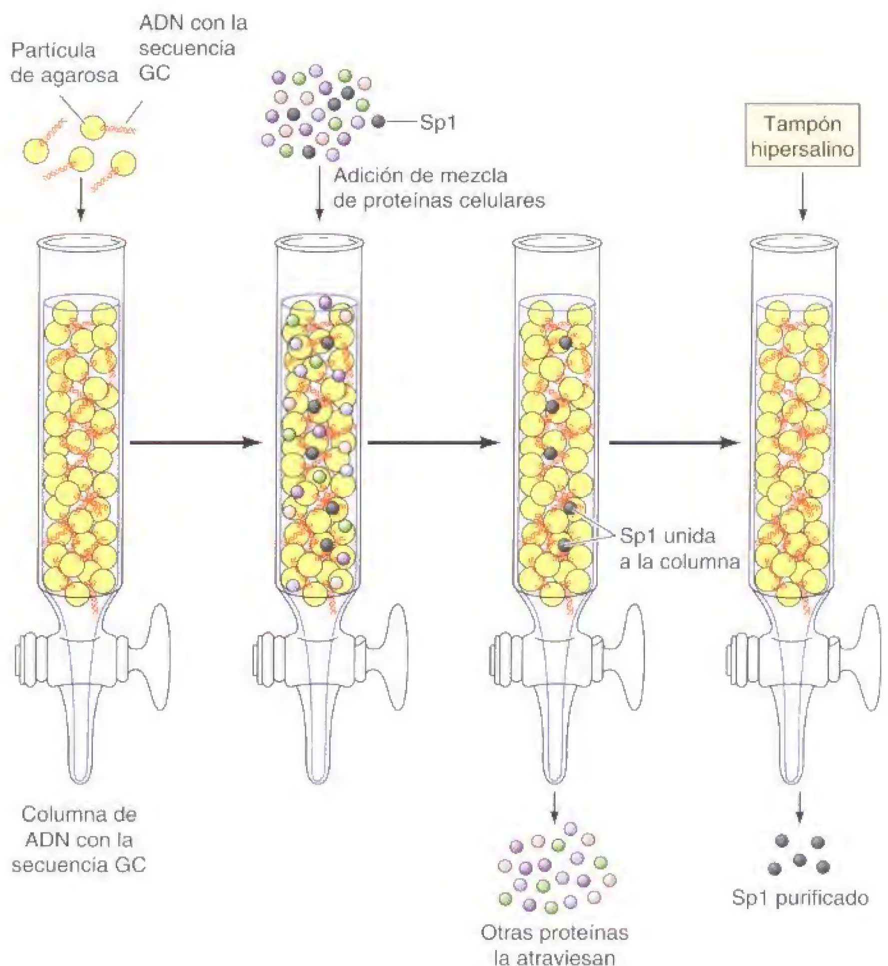
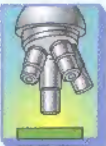



*Figura 6.25*
**Purificación de la Sp1 mediante cromatografía de afinidad por ADN.** Se adhieren oligonucleótidos de doble cadena que contienen secuencias repetidas de secuencias GC a partículas de agarosa, y se traspasan a una columna. Se añaden entonces a la columna una mezcla de proteínas celulares con la Sp1; dado que la Sp1 se une de manera específica a los oligonucleótidos con la secuencia GC, es retenida en la columna, mientras que otras proteínas la atraviesan. Tras lavar la columna con un tampón hipersalino se disocian la Sp1 del ADN con la secuencia GC, con lo que se obtiene la proteína Sp1 purificada.



## Experimento clave

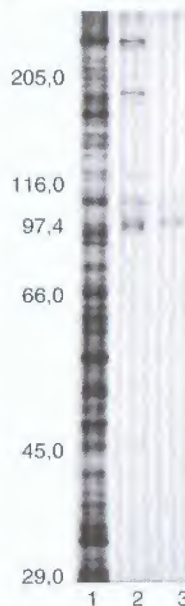
# Aislamiento de un factor de transcripción eucariótico

**Purificación por afinidad de proteínas de unión a secuencias específicas del ADN**
James T. Kadonaga y Robert Tjian
University of California, Berkeley
*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volume 83, págs. 5889-5893*

## Contexto

Tras los estudios del operón *lac* por Jacob y Monod, quedó claro que la transcripción está regulada por proteínas que se unen a determinadas secuencias de ADN. Un prototipo de los estudios de la expresión génica en células eucarióticas es el del virus de los monos SV40, en el cual se identificaron varias secuencias reguladoras del ADN a principios de la década de 1980. En 1983 William Dynan y Robert Tijan demostraron por primera vez que una de estas secuencias (la secuencia GC) es el sitio de unión específico de una proteína detectable en extractos nucleares de células humanas. Esta proteína (llamada proteína específica 1 o Sp1) no sólo se une a la secuencia GC, sino que también estimula la transcripción *in vitro*, lo que confirma que es un activador de la transcripción específico de secuencia.

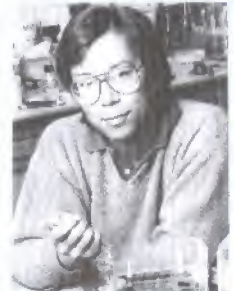
Para estudiar el mecanismo de acción de la Sp1 era necesario obtener el factor de transcripción en forma pura así como clonar el gen de la Sp1. Se convirtió así en una prioridad aislar a la Sp1 de forma pura, aunque suponía un reto técnico importante. Tanto la Sp1 como otros factores de transcripción representan tan sólo alrededor del 0,001 % del total de las proteínas celulares, por lo que no pueden ser purificadas por las técnicas bioquímicas convencionales. James Kadonaga y Robert Tijan solventaron el problema desarrollando un método de cromatografía por afinidad al ADN, que llevó a la purificación no sólo de la Sp1 sino también otros muchos factores de transcripción eucarióticos, abriendo por tanto el camino para el análisis molecular de la regulación de la transcripción en células eucarióticas.




Purificación de la Sp1. Electroforesis en gel de las proteínas presentes inicialmente en el extracto nuclear bruto (carril 1) y de las proteínas obtenidas tras uno o dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN (carriles 2 y 3, respectivamente). Se indica a la izquierda del gel el tamaño de las proteínas marcadoras de peso molecular (en kilodaltons), y mediante flechas los polipéptidos de la Sp1.

## Experimentos

La cromatografía de afinidad al ADN, desarrollada por Kadonaga y Tjian, es un método que se basa en la unión específica y con una alta afinidad entre la Sp1 y la secuencia GC, GGGCGG. Se emparejaron con partículas sólidas oligonucleótidos sintéticos poseedores de múltiples copias de esta secuencia, y se hizo pasar un extracto nuclear bruto a través de esta columna de partículas ligadas a secuencias GC del ADN. A continuación las partículas fueron lavadas para eliminar las proteínas que no quedaron unidas de manera específica con los oligonucleótidos. Por último, se realizó otro lavado de las partículas con suero salino hipertónico (ClK 0,5M), con el objetivo de separar la Sp1 del ADN y liberar por tanto la Sp1 de la columna.



Robert Tjian

La electroforesis en gel demostró que el extracto nuclear bruto aplicado inicialmente a la columna era una mezcla compleja de proteínas (véase Figura). Por el contrario, aproximadamente el 90 % de las proteínas recuperadas tras dos ciclos de cromatografía de afinidad al ADN corresponden a sólo dos polipéptidos, identificados como Sp1 por su unión al ADN y por su actividad en estudios de transcripción *in vitro*. Por tanto, la Sp1 ha sido eficazmente purificada mediante la cromatografía de afinidad por el ADN.

## Impacto

En su documento de 1986, Kadonaga y Tijan afirman que la técnica de cromatografía por afinidad al ADN «debería ser aplicable a la purificación de otras proteínas de unión a secuencias específicas del ADN». Esta predicción ha sido ampliamente confirmada; ha sido posible aislar muchos factores de transcripción eucarióticos gracias a este método. Los genes que codifican otros factores de transcripción se han aislado por otro mecanismo alternativo (desarrollado de manera independiente por los laboratorios de Phillip Sharp y de Steven McKnight en 1988) en el cual se revisan las bibliotecas de expresión de ADNc mediante sondas de oligonucleótidos para detectar proteínas recombinantes que se unen específicamente a las secuencias deseadas del ADN. La posibilidad de aislar proteínas de unión a secuencias específicas del ADN por estos métodos ha permitido la descripción detallada de la estructura y el funcionamiento de una amplia variedad de proteínas reguladoras de la transcripción, proporcionando las bases para la actual comprensión de la expresión génica en células eucarióticas.

la secuencia GC con alta afinidad, quedaba específicamente retenida en la columna. Se pudo por tanto obtener proteína Sp1 altamente purificada para ser utilizada en estudios posteriores, incluyendo la determinación parcial de su secuencia de aminoácidos, que a su vez llevó a la clonación del gen que codifica la Sp1.

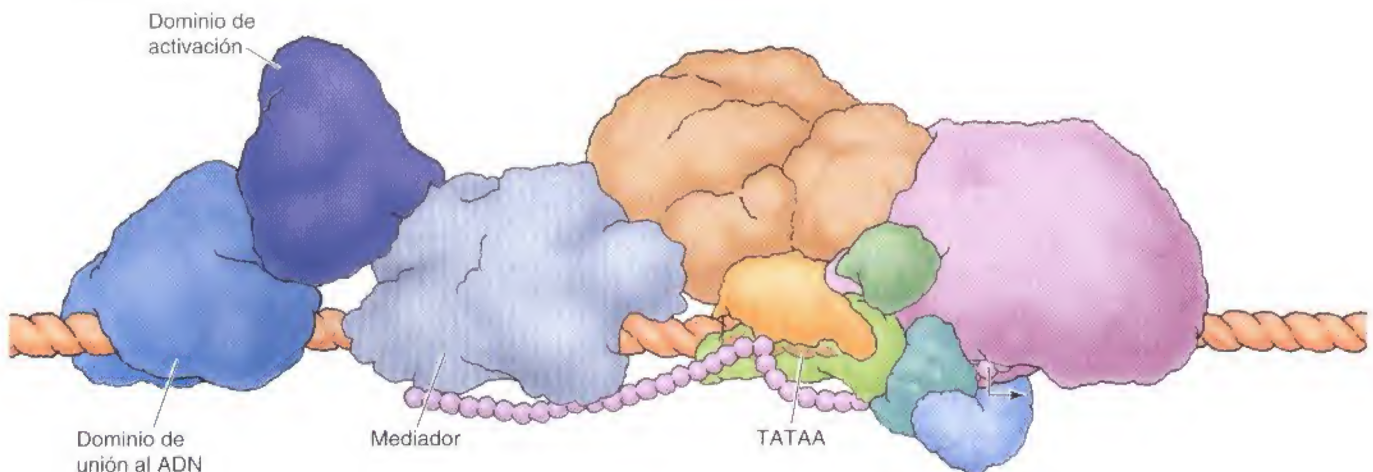
La cromatografía de afinidad por ADN, utilizada por primera vez en la purificación de la Sp1, ha sido utilizada con éxito para aislar una amplia variedad de proteínas de unión al ADN con especificidad de secuencia a partir de células eucariotas. Los genes que codifican otros factores de transcripción han sido aislados mediante el análisis de bibliotecas de ADNc de expresión para identificar proteínas recombinantes que se unen a secuencias específicas del ADN. El clonaje y secuenciación de ADNcs de factores de transcripción ha llevado a la acumulación de una gran cantidad de información sobre la estructura y función de estas críticas proteínas reguladoras.

### *Estructura y función de los activadores de la transcripción*

Dado que los factores de transcripción son fundamentales para la regulación de la expresión génica, la comprensión de sus mecanismos de acción es actualmente una importante área de investigación en biología celular y molecular. De estas proteínas, las estudiadas con mayor profundidad son los **activadores de la transcripción**, que, como la Sp1, se unen a secuencias reguladoras de ADN y estimulan la transcripción. Estos factores constan en general de dos dominios: una región de la proteína se une específicamente al ADN; la otra activa la transcripción interactuando con otros componentes de la maquinaria transcripcional (Fig. 6.26). Los activadores de la transcripción parecen ser proteínas modulares, dado que los dominios de unión al ADN y de activación de distintos factores pueden ser frecuentemente intercambiados utilizando técnicas de ADN recombinante. Dichas manipulaciones producen factores de transcripción híbridos, que activan la transcripción uniéndose a secuencias promotoras o intensificadoras determinadas por la especificidad de sus dominios de unión al ADN. Por lo tanto parece que la función básica del dominio de unión al ADN es anclar el factor de transcripción al sitio apropiado en el ADN; posteriormente el dominio de activación estimula de forma independiente la transcripción interactuando con otras proteínas.

Como era de esperar, dada la especificidad tisular de la expresión génica en organismos multicelulares complejos, han sido identificados muchos factores de transcripción en células eucarióticas. La caracterización molecular de estas proteínas ha mostrado que los dominios de unión al ADN están relacionados entre sí (Fig. 6.27). Los **dominios en dedos de cinc** contienen repeticiones de residuos de cisteína e histidina que ligan iones de cinc y se pliegan en bucles

*Figura 6.26*
**Estructura de los activadores de la transcripción.** Los activadores de la transcripción constan de dos dominios independientes. El dominio de unión al ADN reconoce una secuencia de ADN específica, y el dominio de activación interacciona con otros elementos de la maquinaria de la transcripción.



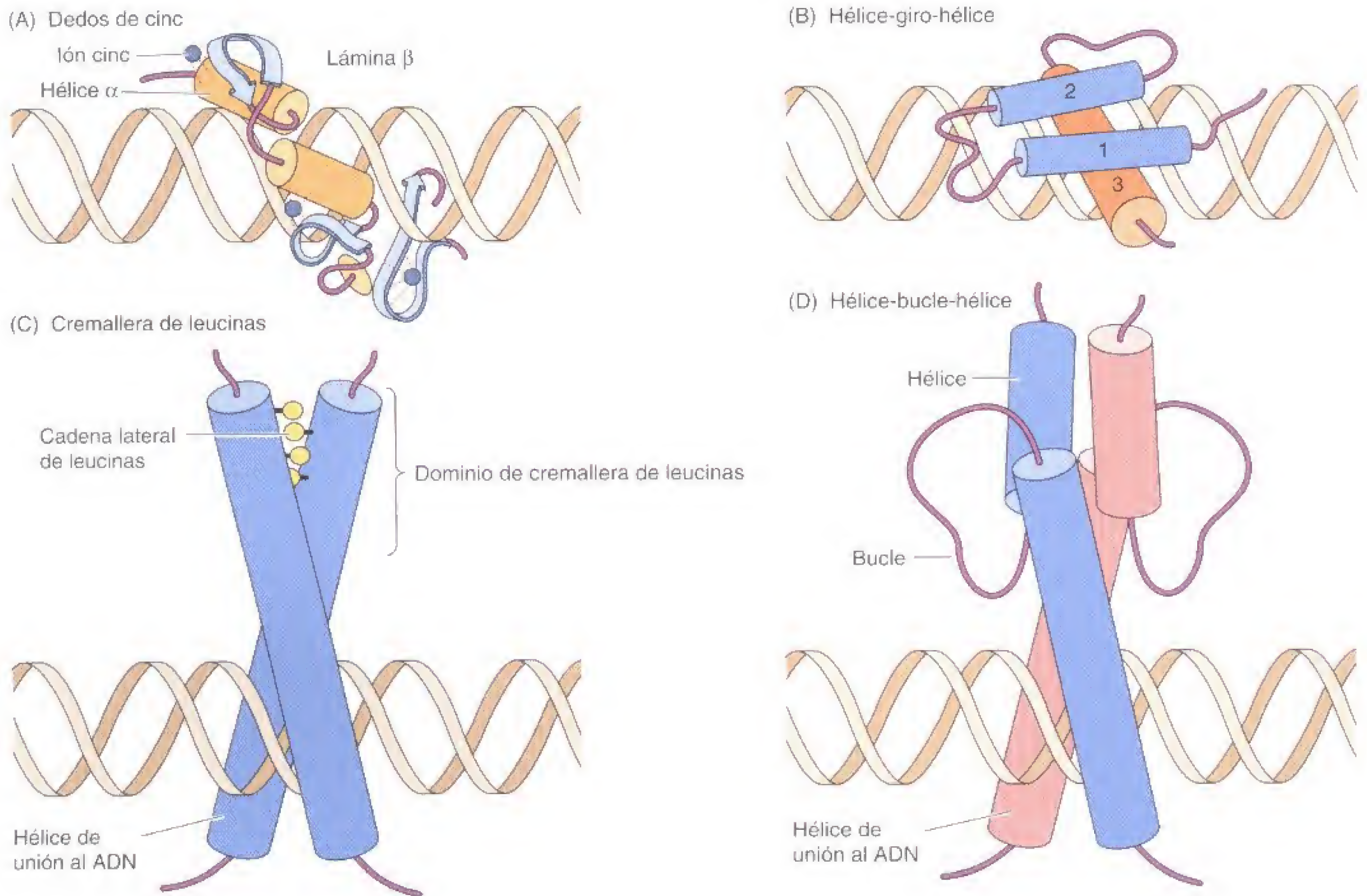



*Figura 6.27*
**Familias de dominios de unión al ADN.** (A) Los dominios en dedo de cinc son bucles en los que una hélice α y una lámina β engloban de manera coordinada un ión cinc. (B) Los dominios hélice-giro-hélice constan de tres regiones helicoidales (o en algunos casos cuatro). Una de las hélices (la hélice 3) es la que realiza la mayor parte de los contactos con el ADN, mientras que las hélices 1 y 2 se apoyan encima y estabilizan la interacción. (C) Los dominios de unión al ADN de proteínas con cremallera de leucinas están formados por dos cadenas polipeptídicas distintas. Las responsables de la dimerización son las interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas de residuos de leucina expuestos en uno de los lados de cada región helicoidal (cremallera de leucinas). Inmediatamente detrás de la cremallera de leucinas está la hélice de unión al ADN, rica en aminoácidos básicos. (D) Los dominios con estructura hélice-bucle-hélice son parecidos a los de cremallera de leucinas, excepto en que los dominios de dimerización de cada una de estas proteínas consisten en dos regiones helicoidales separadas por un bucle.

(«dedos») que se unen al ADN. Estos dominios fueron inicialmente identificados en el factor de transcripción de la ARN polimerasa III TFIIIA pero se encuentran también en factores de regulación transcripcionales de los promotores de la polimerasa II, incluyendo la Sp1. Otros ejemplos de factores de transcripción que posee dominios en dedos de cinc son los **receptores de hormonas esteroideas**, que regulan la transcripción génica en respuesta a hormonas como los estrógenos y la testosterona.

La estructura **hélice-vuelta-hélice** se describió inicialmente en proteínas de unión al ADN procarióticas, como la proteína activadora de catabolitos (CAP) de *E. coli.* En estas proteínas una hélice realiza la mayor parte del contacto con el ADN, mientras que las otras hélices estabilizan la interacción. En las células eucarióticas un tipo de proteínas con conformación hélice-vuelta-hélice son las proteínas con **dominios homeo**, que tienen un papel crítico en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario. Los genes que codifican estas proteínas fueron descubiertos en mutantes *Drosophila.* Algunos de los mutantes de *Drosophila* descritos inicialmente (denominados mutantes homeóticos en 1894) daban lugar al desarrollo de moscas en las que una parte del cuerpo estaba sustituida por otra. Por ejemplo, en el mutante homeótico *Antennapedia* crecen patas en vez de antenas en la cabeza de la mosca (Fig. 6.28). El análisis genético de estos mutantes, iniciado por Ed Lewis en los años 40, ha evidenciado que *Drosophila* contiene seis genes homeóticos, cada uno de los cuales especifica la identidad de un segmento corporal. La clonación molecular y el análisis de estos genes ha puesto de manifiesto que contienen secuencias conservadas de 180 pares de bases (denominadas **secuencias homeo** u ***homeoboxes***) que codifican los dominios de unión al ADN (dominios homeo) de

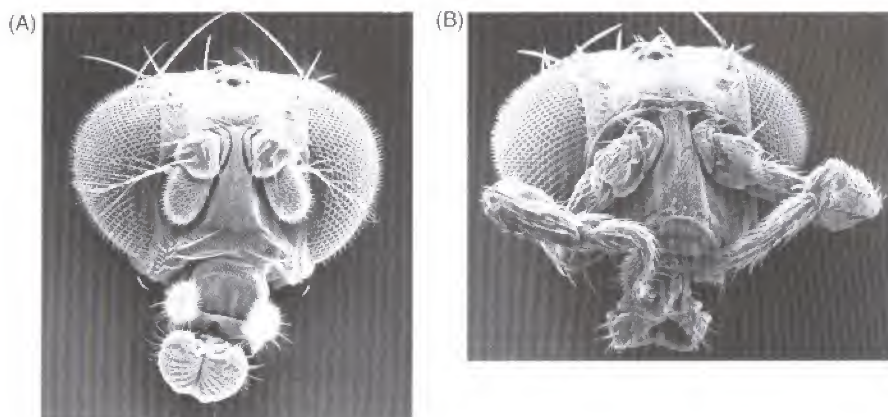



*Figura 6.28*
**Mutación *Antennapedia*.** Las moscas mutantes *Antennapedia* tienen en la cabeza patas en lugar de antenas. (A) Cabeza de una mosca normal. (B) Cabeza de una mosca mutante *Antennapedia*. (Cortesía de F. Rudolf Turner, Universidad de Indiana).

los factores de la transcripción. Desde entonces han sido identificadas una gran variedad de proteínas con homeodominios en hongos, plantas y otros animales, incluidos los humanos. Los genes de las *homeoboxes* humanas son llamativamente similares a sus homólogos en *Drosophila* en cuanto a su estructura y función, demostrando la alta conservación de las funciones de estos factores de transcripción en el desarrollo animal.

Otras dos familias de proteínas de unión al ADN, las proteínas con **cremallera de leucinas** y con **estructura hélice-bucle-hélice**, contienen dominios de unión al ADN formados por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. La cremallera de leucinas contiene cuatro o cinco residuos de leucina separados por intervalos de siete aminoácidos, quedando sus cadenas laterales hidrofóbicas expuestas en un lado de una región helicoidal. Esta región sirve de dominio de dimerización para las dos subunidades proteínicas, que permanecen unidas por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de las leucinas. Inmediatamente después de la cremallera de leucinas existe una región rica en aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) que se unen al ADN. Las proteínas con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una estructura similar, exceptuando que sus dominios de dimerización están formados por dos regiones helicoidales cada uno, separados por un bucle. Una característica importante de los factores de transcripción con cremallera de leucinas y estructura hélice-bucle-hélice es que distintos miembros de estas familias pueden formar dímeros entre ellos. Por lo tanto, la combinación de distintas subunidades de proteínas puede dar lugar a un mayor abanico de factores que pueden diferir en la secuencia de ADN reconocida y en las actividades de estimulación de la transcripción. Las proteínas con cremallera de leucinas y con estructura de hélice-bucle-hélice tienen una importante función en la regulación de la expresión génica inducible con especificidad tisular, y la formación de dímeros entre diferentes miembros de sus familias es un aspecto crucial del control de su función.

Los dominios activadores de los factores de transcripción no están tan bien caracterizados como sus dominios de unión al ADN. Algunos de ellos, denominados dominios de activación acídicos, son ricos en residuos cargados negativamente (aspartato y glutamato); otros son ricos en residuos de prolina o glutamina. Los dominios de activación de los factores de transcripción eucarióticos estimulan la transcripción mediante dos mecanismos diferentes (Fig. 6.29). En primer lugar, interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales, como TFIIB o TFIID, para reclutar la ARN polimerasa y facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción sobre el promotor, similar a los activadores transcripcionales de las bacterias (ver Fig. 6.10). Además, los factores de transcripción eucarióticos interactúan con una variedad de **coactivadores** que estimulan la transcripción modificando la estructura de la cromatina, como se estudia más adelante en este capítulo.

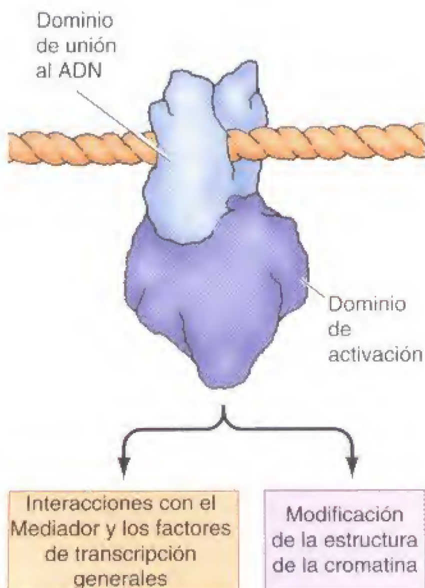



*Figura 6.29*
**Actuación de los activadores transcripcionales.** Los activadores eucarióticos estimulan la transcripción por dos mecanismos. Interactúan con las proteínas del Mediador y con los factores de transcripción generales para facilitar el ensamblaje de un complejo de transcripción, e interactúan con los coactivadores para facilitar la transcripción modificando la estructura de la cromatina.

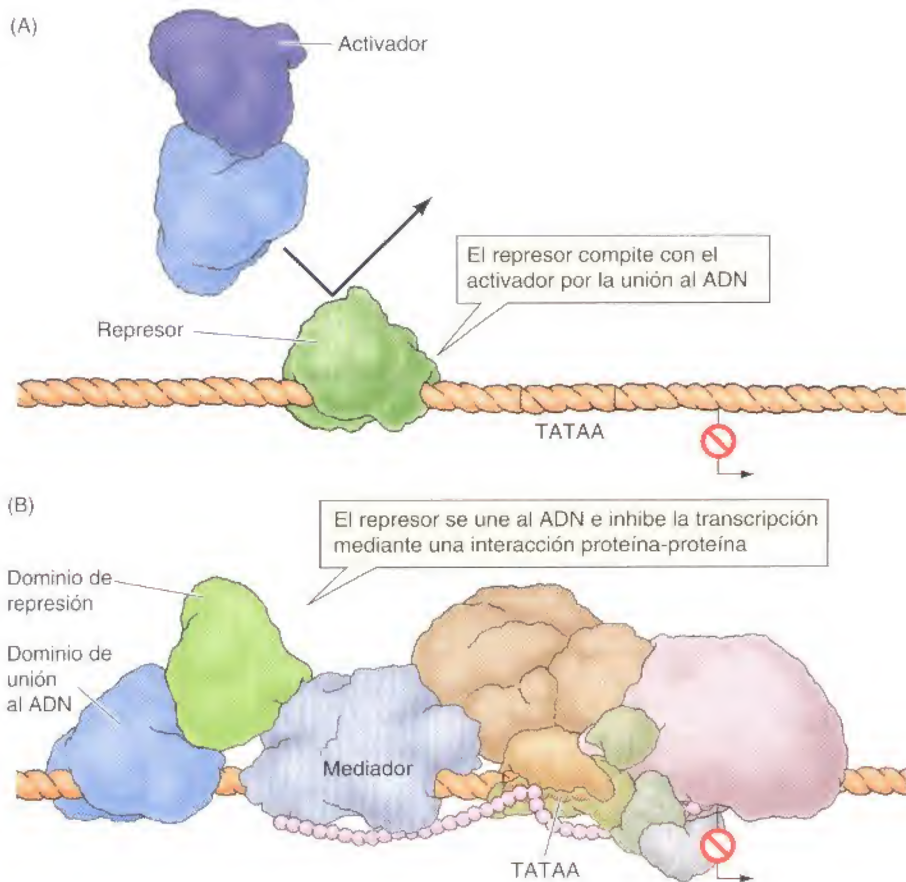



*Figura 6.30*
**Acción de los represores eucarióticos.** (A) Determinados represores bloquean la unión de activadores a secuencias reguladoras. (B) Otros represores tienen dominios de represión activos que inhiben la transcripción mediante interacciones con proteínas mediadoras o factores de transcripción generales, además de con correpresores que actúan para modificar la estructura cromatínica.

## *Represores eucarióticos*

La expresión génica en células eucarióticas está regulada por represores además de por activadores de la transcripción. De igual forma que sus homólogos procarióticos, los represores de eucariotas se unen a secuencias específicas de ADN e inhiben la transcripción. En algunos casos, los represores eucarióticos simplemente interfieren con la unión de otros factores transcripcionales al ADN (Fig. 6.30 A). Por ejemplo, la unión de un represor cerca del sitio de iniciación de la transcripción puede bloquear la interacción de la ARN polimerasa o de factores generales de transcripción con el promotor, de forma similar a los represores bacterianos. Otros represores compiten con los activadores por unirse a secuencias específicas de regulación. Algunos de estos represores contienen el mismo dominio de unión al ADN que el activador, pero carecen de su dominio activador. El resultado de su unión al promotor o al estimulador es el bloqueo de la unión del activador, inhibiendo por tanto la transcripción.

En contraste con los represores que simplemente interfieren con la unión de activadores, muchos represores (denominados represores activos) contienen dominios específicos que inhiben la transcripción por medio de interacciones proteína-proteína (Fig. 6.30B). El primero de estos represores fue descrito en 1990 en

estudios sobre un gen denominado *Krüppel*, que interviene en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. El análisis molecular de la proteína Krüppel ha demostrado que contiene un dominio de represión enlazado a un dominio con estructura de dedos de cinc de unión al ADN. El dominio de represión Krüppel puede intercambiarse con distintos dominios de unión al ADN de otros factores transcripcionales. Estas moléculas híbridas también reprimen la transcripción, indicando que el dominio represor de Krüppel inhibe la transcripción por medio de interacciones proteína-proteína, independientemente de su sitio de unión al ADN.

Muchos de los represores activos encontrados tienen una función clave en la regulación de la transcripción de células animales, siendo en ocasiones los reguladores principales del crecimiento y la diferenciación celulares. Al igual que en el caso de los activadores de la transcripción, se han identificado diversos dominios represores. Por ejemplo, el dominio represor de Krüppel es rico en residuos de alanina, mientras que otros dominios represores son ricos en prolina o residuos acídicos. Los objetivos de los represores también son diversos, los represores pueden inhibir la transcripción interactuando con proteínas activadoras específicas, con proteínas del Mediador o factores de transcripción generales, y con **correpresores** que actúan modificando la estructura de la cromatina.

La regulación de la transcripción por medio de represores además de con activadores amplía de forma considerable el abanico de mecanismos que controlan la expresión de los genes eucarióticos. La inhibición de la expresión de genes con especificidad tisular parece ser una importante función de los represores. Por ejemplo, como fue expuesto previamente, se cree que un sitio para la unión de un represor en el estimulador del gen de las inmunoglobulinas contribuye a su expresión con especificidad tisular suprimiendo su transcripción en células no linfoides. Otros represores desempeñan un papel crucial en el control de la proliferación y diferenciación celulares en respuesta a hormonas y factores de crecimiento (véanse Caps. 13 y 14).

### *Relación entre la estructura cromatínica y la transcripción*

Tal y como se mencionó en la exposición previa, tanto los activadores como los represores regulan la transcripción en eucariotas no sólo interaccionando con otros componentes de la maquinaria transcripcional, sino también induciendo cambios en la estructura de la cromatina. En lugar de estar presente en el interior del núcleo como el ADN desnudo, el ADN de todas las células eucarióticas se encuentra fuertemente unido a las histonas. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 146 pares de bases de ADN enrollado en torno a dos moléculas compuestas cada una por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, con una molécula de histona H1 unida al ADN donde entra en la partícula del nucleosoma (ver Fig. 4.12). La cromatina se condensa aún más, enrollándose en estructuras de orden superior organizadas en grandes bucles de ADN. Este empaquetamiento del ADN eucariótico en cromatina claramente posee importantes consecuencias en términos de disponibilidad como molde para la transcripción, de modo que la estructura de la cromatina es un aspecto crítico para la expresión génica en las células eucarióticas.

Los genes transcritos activamente se encuentran en cromatina relativamente descondensada, probablemente correspondiendo a las fibras de cromatina de 30-nm descritas en el Capítulo 4 (ver Fig. 4.13). Por ejemplo, la visualización microscópica de los cromosomas politénicos de *Drosophila* indica que las regiones del genoma que están implicadas activamente en la síntesis de ARN corresponden a regiones cromosómicas descondensadas (Fig. 6.31). No obstante, los genes transcritos activamente permanecen unidos a histonas y empaquetados en nucleosomas, de modo que los factores de transcripción y la ARN polimerasa siguen enfrentándose al problema de interaccionar con la cromatina en lugar de con el ADN desnudo. El estrecho enrollamiento del ADN en torno al núcleo de la partícula del nucleosoma es un gran obstáculo para la

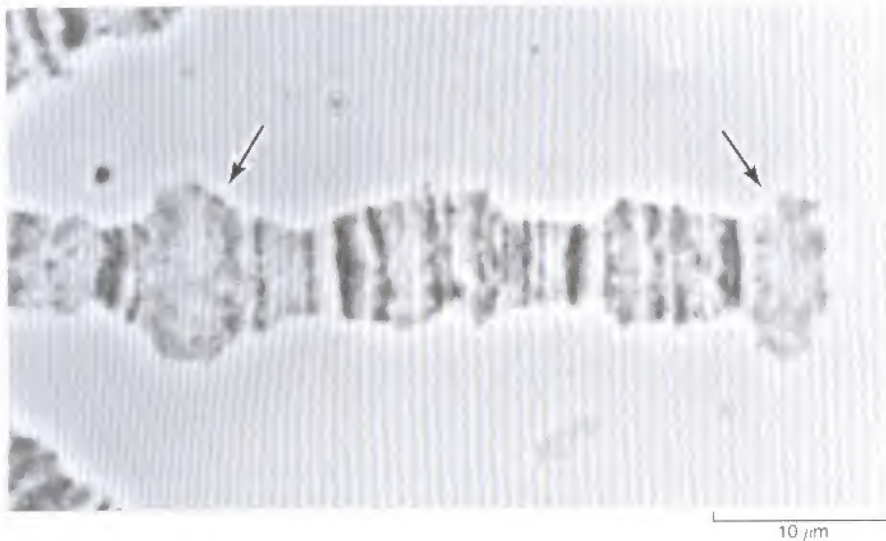


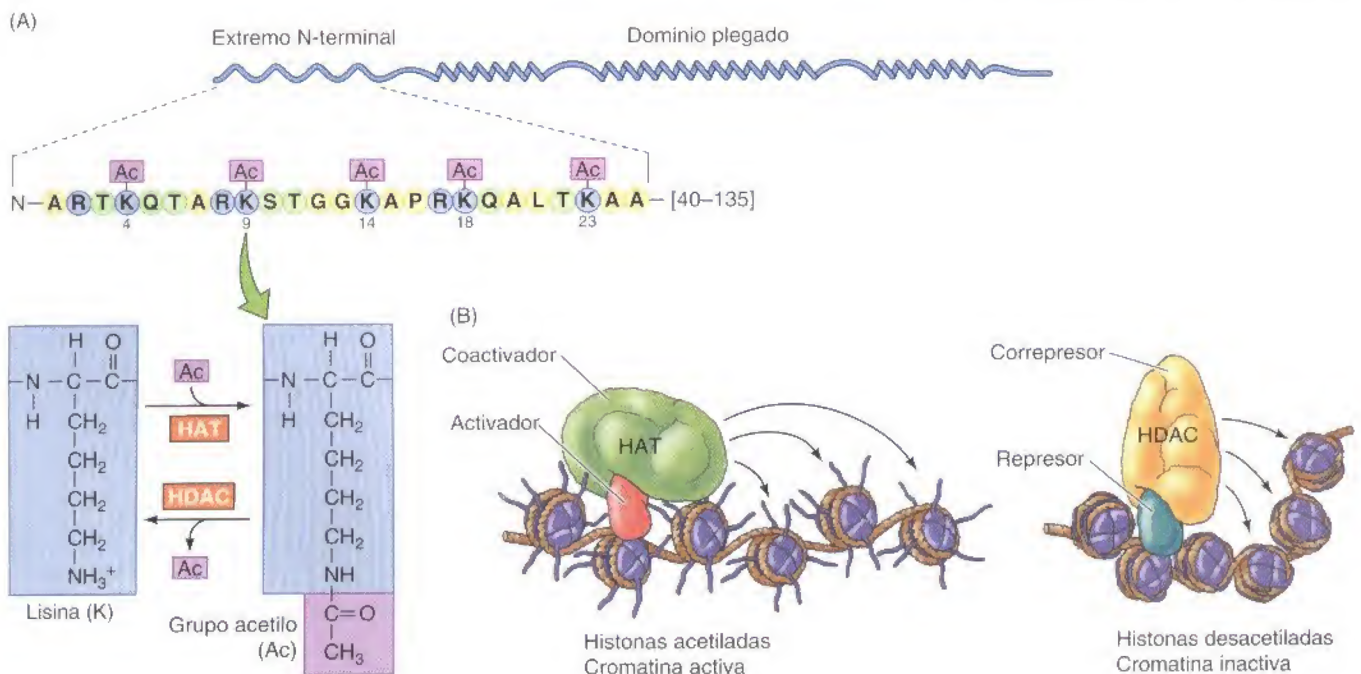

*Figura 6.31*
**Regiones cromosómicas descondensadas de *Drosophila*.** Imagen de microscopio óptico que muestra regiones descondensadas de cromosomas politénicos (flechas), que son activas en la síntesis de ARN. (Cortesía de Joseph Gall, Carnegie Institute).

transcripción, afectando tanto a la capacidad de los factores de transcripción de unirse al ADN como a la capacidad de la ARN polimerasa de transcribir a través de un molde de cromatina.

Diversas modificaciones son características de la cromatina transcripcionalmente activa, incluyendo modificaciones de histonas, reorganizaciones de nucleosomas y la asociación con dos proteínas cromosómicas no histonas, denominadas **proteínas HMGN**, con los nucleosomas de genes activamente transcritos. Los sitios de unión de las proteínas HMGN en los nucleosomas solapan con el sitio de unión de la histona H1, y parece que las proteínas HMGN estimulan la transcripción alterando la interacción de la histona H1 con nucleosomas para mantener una estructura descondensada de la cromatina.

La **acetilación de las histonas** se ha correlacionado con la cromatina transcripcionalmente activa en una amplia variedad de tipos celulares (Fig. 6.32). Las histonas del núcleo (H2A, H2B, H3 y H4) tienen dos dominios: un dominio plega-

*Figura 6.32*
**Acetilación de histonas.** (A) Las histonas del núcleo tienen dominios plegados que interaccionan con otras histonas y con el ADN en el nucleosoma, y extremos N-terminales, que se extienden por fuera del nucleosoma. Los extremos N-terminales de las histonas del núcleo (p. ej., H3) son modificados añadiendo grupos acetilo (Ac) en las cadenas laterales de determinados residuos de lisina. (B) Los activadores y represores de la transcripción se asocian con coactivadores y correpresores, con actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) y desacetilasa de histonas (HDAC) respectivamente. La acetilación de histonas es característica de la cromatina transcrita activamente y puede debilitar la unión de las histonas al ADN o alterar sus interacciones con otras proteínas.



do, que interviene en las interacciones con otras histonas y en el enrollamiento del ADN alrededor del núcleo del nucleosoma, y un dominio o extremo amino-terminal, que se extiende por fuera del nucleosoma. El extremo amino-terminal es rico en lisina y puede ser modificado por acetilación en residuos de lisina específicos. La acetilación reduce la carga positiva neta de las histonas, y puede debilitar su unión al ADN así como alterar sus interacciones con otras proteínas. Además, la acetilación de histonas se ha demostrado que facilita la unión de factores de transcripción al ADN nucleosómico, lo que indica que la acetilación de histonas incrementa la accesibilidad de la cromatina a las proteínas de unión al ADN.

Estudios de dos grupos de investigadores en 1996 proporcionaron vínculos directos entre la acetilación de las histonas y la regulación transcripcional, demostrando que los activadores y represores transcripcionales están asociados con histona acetiltransferasas y deacetilasas, respectivamente. Esta asociación se descubrió en primer lugar mediante la clonación de un gen que codificaba una histona acetiltransferasa de *Tetrahymena*. Sorprendentemente, la secuencia de esta histona acetiltransferasa estaba estrechamente relacionada con un coactivador transcripcional de levaduras previamente conocido, denominado Gcn5p, que estimula la transcripción en asociación con diversos activadores transcripcionales específicos de secuencia. Más experimentos demostraron que la propia Gcn5p posee actividad histona acetiltransferasa, sugiriendo que la activación transcripcional resulta directamente de la acetilación de histonas. Estos resultados se han extendido mediante demostraciones de que las histona acetiltransferasas también se asocian con un número de coactivadores transcripcionales en mamíferos, además de con el factor de transcripción general TFIID. Por el contrario, muchos correpresores transcripcionales tanto en levaduras como en células de mamífero funcionan como histona deacetilasas, y retiran los grupos acetilo de las colas de las histonas. La acetilación de histonas es por tanto, dirigida directamente por activadores y represores transcripcionales, lo que indica que juega un papel clave en la regulación de la expresión génica eucariótica.

Las histonas no sólo se modifican por acetilación, sino también por fosforilación de residuos de serina, metilación de residuos de lisina y arginina, y adición de ubiquitina (un pequeño péptido estudiado en el Capítulo 7) a residuos de lisina. Al igual que la acetilación, estas modificaciones ocurren en residuos aminoacídicos específicos de las colas de histonas y se asocian con cambios en la actividad transcripcional (Figura 6.33). Además de afectar a la estructura de la cromatina, se ha propuesto que modificaciones específicas de las histonas afectan a la expresión génica proporcionando sitios de unión para otras proteínas reguladoras transcripcionales. De acuerdo con esta hipótesis, combinaciones de modificaciones específicas de las histonas constituyen un «**código de histonas**» que regula la expresión génica reclutando otras proteínas reguladoras al molde de cromatina. Por ejemplo, la cromatina transcripcionalmente activa se asocia con varias modificaciones específicas de la histona H3, incluyendo la metilación de la lisina-4, fosforilación de la serina-10 y acetilación de la lisina-9 y la lisina-14. Por el contrario, la metilación de la lisina-9 se asocia con la represión, y la enzima que cataliza la metilacion de H3 lisina-9 es reclutada a los genes diana por los correpresores. Los residuos H3 lisina-9 además funcionan como sitios de unión para proteínas que inducen la condensación cromatínica,

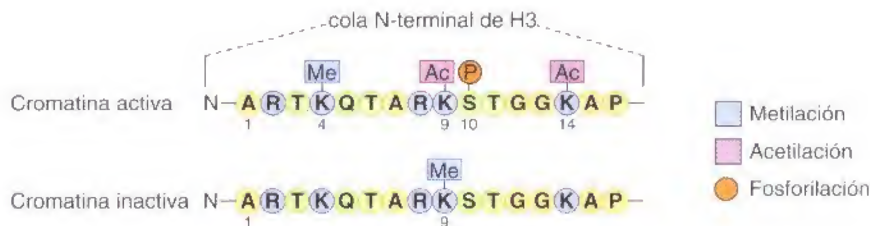



*Figura 6.33*
**Metilación y fosforilación de histonas.** La actividad transcripcional de la cromatina está afectada por la metilación y fosforilación de residuos aminoacídicos específicos presentes en la cola de las histonas. Por ejemplo, la cromatina transcripcionalmente activa está caracterizada por la presencia en H3 de metilación de la lisina-4, fosforilación de serina-10 y acetilación de lisina-9 y lisina-14. Por el contrario, la cromatina inactiva se caracteriza por la metilación de H3 en la lisina-9.

vinculando directamente esta modificación histónica con la represión transcripcional.

Resulta notable que estas modificaciones de las colas histónicas se regulan unas a otras, dando lugar al establecimiento de patrones claros de modificación de histonas que se correlacionan con la actividad transcripcional. Por ejemplo, la fosforilación de H3 serina-10 estimula la acetilación de lisina-14, pero inhibe la metilación de lisina-9, estableciendo un patrón de modificación de H3 que es característico de la cromatina transcripcionalmente activa. La metilación de la lisina-4 también inhibe la metilación de la lisina-9 y viceversa, lo que resulta coherente con los efectos opuestos de la metilación de estos dos residuos de lisina sobre la activación transcripcional frente a la represión. La interrelación entre modificaciones de los distintos residuos resulta pues en patrones de modificación de histonas que puede proporcionar un código regulador estable para la actividad transcripcional de la cromatina.

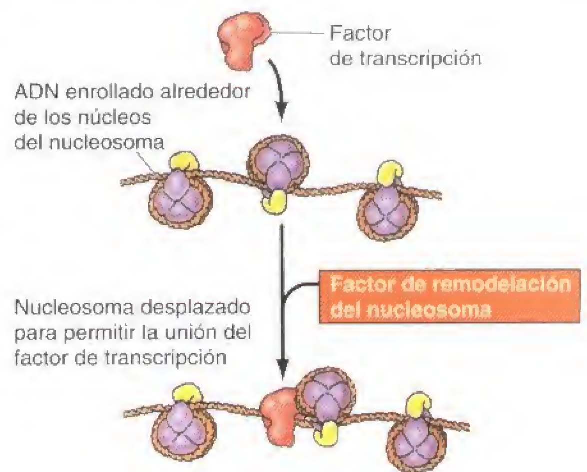



*Figura 6.34*
**Factores de remodelación de los nucleosomas.** Los factores de remodelación de nucleosomas facilitan la unión de factores de transcripción a la cromatina mediante la recolocación de los nucleosomas en el ADN.

A diferencia de las enzimas que regulan la estructura cromatínica modificando las histonas, los **factores remodeladores del nucleosoma** son complejos proteicos que alteran la organización o estructura de los nucleosomas, sin retirar ni modificar covalentemente a las histonas (Fig. 6.34). Un mecanismo por el que actúan los factores remodeladores del nucleosoma es catalizando el deslizamiento de los octámeros de histonas sobre la molécula de ADN, reposicionando así a los nucleosomas para modificar la accesibilidad de secuencias específicas de ADN para los factores de transcripción. Por otro lado, los factores remodeladores del nucleosoma pueden actuar induciendo cambios en la conformación de los nucleosomas, afectando de nuevo a la capacidad de secuencias específicas de ADN de interaccionar con proteínas reguladoras transcripcionales. Al igual que las enzimas modificadoras de enzimas, los factores remodeladores pueden ser reclutados al ADN en asociación con activadores o represores de la transcripción, y pueden alterar la disposición de los nucleosomas para estimular o inhibir la transcripción.

El reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas y factores remodeladores del nucleosoma por los activadores transcripcionales estimula la iniciación de la transcripción alterando la estructura cromatínica de las regiones *enhancer* y promotoras. Sin embargo, tras la iniciación de la transcripción, la ARN polimerasa sigue enfrentándose al problema de la elongación transcripcional a través del molde de cromatina. Quizás sorprendentemente, el empaquetamiento del ADN en nucleosomas no presenta una barrera impenetrable para la ARN polimerasa, que es capaz de transcribir a través de un núcleo nucleosómico rompiendo los contactos histona-ADN. La capacidad de la ARN polimerasa de transcribir moldes de cromatina está facilitada por la asociación de las proteínas HMGN con los nucleosomas de los genes activamente transcritos, además de por los **factores de elongación** que se asocian con el dominio C-terminal fosforilado de la ARN polimerasa II cuando se inicia la transcripción (véase Fig. 6.14). Estos factores de elongación reclutan histona acetiltransferasas, además de actuar directamente para romper la estructura del nucleosoma durante la transcripción.

## *Regulación de la transcripción por ARNs no codificantes*

Una serie de avances recientes indica que la expresión génica puede estar regulada no sólo por las proteínas reguladoras transcripcionales de las que se ha hablado hasta el momento, sino también por moléculas de ARN reguladoras no codificantes. Un modo de acción de los ARNs reguladores no codificantes es inhibir la traducción por interferencia de ARN, un fenómeno en el que los ARNs cortos de doble hebra inducen la degradación de un ARNm homólogo (véase Fig. 3.41). Adicionalmente, los ARNs no codificantes parecen jugar papeles im-

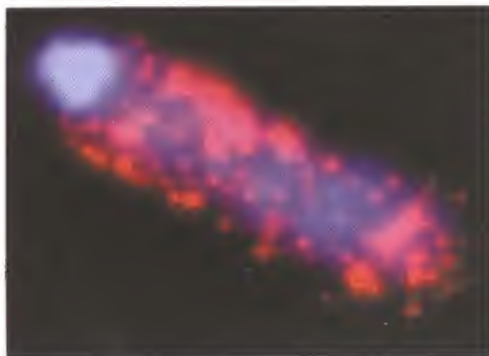


*Figura 6.35*
**Inactivación del cromosoma X.** El cromosoma X nactivo (azul) está cubierto por ARN *Xist* (rojo). (De B. Panning y R. Jaenisch, 1998. *Cell* 93:305.)

portantes en la represión de la transcripción en algunos loci cromosómicos induciendo modificaciones en las histonas que dan lugar a la condensación cromatínica y a la formación de heterocromatina. Aunque queda mucho por conocer acerca de su mecanismo de acción, los ARNs no codificantes claramente juegan papeles importantes en la regulación de la estructura cromatínica y la función de las células eucarióticas.

El fenómeno de la **inactivación del cromosoma X** proporciona un ejemplo del papel de un ARN no codificante en la regulación de la expresión génica en mamíferos. En muchos animales, incluido el hombre, las hembras poseen dos cromosomas X, y los machos poseen un cromosoma X y uno Y. El cromosoma X contiene cientos de genes que no están presentes en el mucho menor cromosoma Y (ver Fig. 4.29). Así, las hembras tienen el doble de copias de la mayoría de los genes del cromosoma X que los machos. A pesar de esta diferencia, las células femeninas y masculinas contienen cantidades equivalentes de las proteínas codificadas por genes del cromosoma X. Esto resulta de un mecanismo de compensación de la dosis, en el que la mayoría de los genes de uno de los dos cromosomas X en las células femeninas se encuentran inactivados tras ser convertidos en heterocromatina en un estadio temprano del desarrollo. En consecuencia, sólo una copia de la mayoría de los genes localizados sobre el cromosoma X está disponible para la transcripción, tanto en células femeninas como masculinas.

Aunque el mecanismo de inactivación del cromosoma X todavía no se comprende por completo, el elemento clave parece ser un ARN no codificante transcrito a partir de un gen regulador, denominado *Xist*, en el cromosoma X inactivo. El ARN *Xist* permanece localizado en el X inactivo, uniéndose y cubriendo este cromosoma (Fig. 6.35). Además, el ARN *Xist* recluta a las proteínas reguladoras que reprimen la transcripción de la mayoría de los genes sobre el X inactivo. A pesar de que estas proteínas están por identificar, resulta claro que un efecto principal del ARN *Xist* es la inducción de la metilación de la lisina-9 de H3, dando lugar a la condensación cromatínica y conversión del X inactivo en heterocromatina.

Recientemente se ha demostrado que los ARNs no codificantes juegan un papel clave en el silenciamiento transcripcional y formación de heterocromatina en los centrómeros de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En este caso, ARNs homólogos a las secuencias centroméricas repetidas de ADN actúan para reprimir la transcripción e inducir la formación de heterocromatina en el centrómero. Curiosamente, la acción de los ARNs reguladores centroméricos en *S. pombe* requiere su conversión en moléculas pequeñas de ARN de doble hebra por parte de la maquinaria celular responsable de generar pequeños ARN de interferencia que bloquean la expresión génica que hacen diana en los ARNm e inducen su degradación.

## *Metilación del ADN*

La metilación del ADN es otro mecanismo general de control de la transcripción en vertebrados relacionado con la estructura de la cromatina. Los residuos de citosina del ADN de los vertebrados pueden ser modificado por la adición de un grupo metilo en el carbono 5 (Fig. 6.36). El ADN se metila específicamente en en residuos de C que preceden a los residuos de G en la cadena de ADN (dinucleótidos CpG). Esta metilación se correlaciona con baja actividad transcripcional en los genes que poseen muchos dinucleótidos CpG en la vecindad de sus promotores. La metilación inhibe la transcripción de estos genes por medio de la acción de una proteína, la MeCP2, que se une de forma específica al ADN metilado y reprime la transcripión. Es interesante reseñar que la MeCP2 forma un complejo con la desacetilasa de histonas, relacionando la metilación del ADN con las alteraciones en la acetilación de las histonas y la estructura de los nucleosomas.

Pese a que la metilación del ADN es capaz de inhibir la transcripción, generalmente parece que sólo los genes que ya están reprimidos se mutilan. En

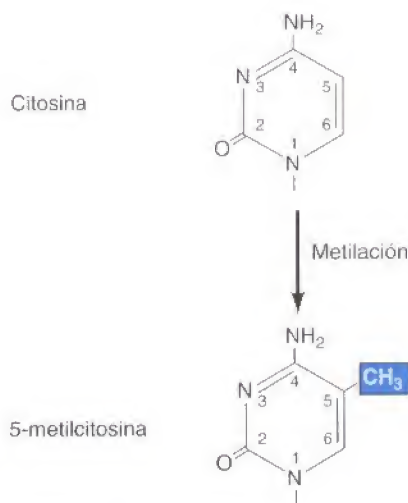



*Figura 6.36*
**Metilación del ADN.** Se añade un grupo metilo al carbono en posición 5 de los residuos de citosina del ADN.

lugar de ser la causa primaria de inactivación transcripcional, la metilación del ADN puede funcionar principalmente para estabilizar y mantener la inactivación génica durante el desarrollo. Por ejemplo, los genes presentes en el cromosoma X inactivo se mutilan después de la represión transcripcional por el ARN *Xist* y la metilación de la lisina-9 de la histona H3, que puede servir para dirigir a las enzimas responsables de inducir la metilación del ADN a genes inactivos. En las plantas, también se ha sugerido que los ARNs no codificantes dirigen la metilación del ADN de genes reprimidos.

Un papel regulador importante de la metilación del ADN se ha establecido en el fenómeno conocido como **impresión** o ***imprinting*** **genómico** que controla la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo embrionario de mamíferos. En la mayoría de los casos, tanto los alelos maternos como los paternos de un gen están expresados en las células diploides. Sin embargo, existen algunos genes impresos (más de dos docenas han sido descritos en ratones y en el hombre) cuya expresión depende de si se heredan de la madre o del padre. En algunos casos, sólo es expresado el alelo parental de un gen impreso, y el alelo materno es transcripcionalmente inactivo. En otros genes impresos, el alelo materno es expresado y el alelo paterno es inactivo.

La metilación del ADN parece jugar un papel clave en la diferenciación entre alelos paternos y maternos de los genes impresos. Un buen ejemplo es el gen *H19*, que se transcribe sólo a partir de la copia materna (Fig. 6.37). El gen *H19* es metilado específicamente durante el desarrollo de células germinales masculinas, pero no en las femeninas. La unión del esperma y del óvulo en la fertilización, genera, por lo tanto, un embrión que contiene un alelo paterno metilado y un alelo materno sin metilar. Estas diferencias en la metilación se mantienen tras la replicación del ADN, por una enzima que específicamente metila secuencias CpG de una hebra hija que se encuentra unida por enlaces de hidrógeno a una hebra parental metilada (Fig. 6.38). Así, el alelo *H19* paterno permanece metilado y transcripcionalmente inactivo en las células embrionarias y en los tejidos somáticos. Sin embargo, el alelo *H19* paterno pierde la metilación en la línea germinal, permitiendo que se establezca un nuevo patrón de metilación para su transmisión a la siguiente generación.

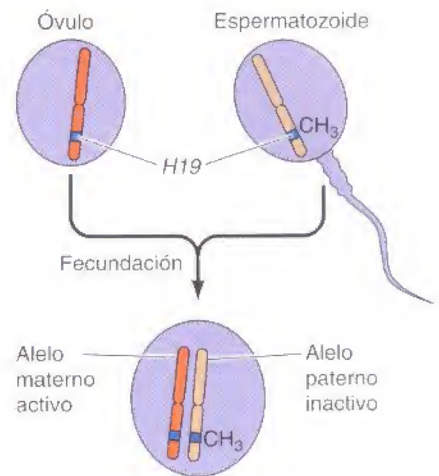



*Figura 6.37*
**Impresión genómica.** El gen *H19* es metilado de forma específica durante el desarrollo de las células germinales masculinas. Por este motivo los espermatozoides contienen un alelo *H19* metilado y los óvulos uno no metilado. Con la fecundación el alelo metilado paterno permanece inactivo transcripcionalmente, y sólo se expresa en el embrión el alelo materno no metilado.

## Maduración y renovación del ARN

Aunque la transcripción es el primer y más regulado paso en la expresión génica, es sólo el principio de una serie de procesos requeridos para producir un

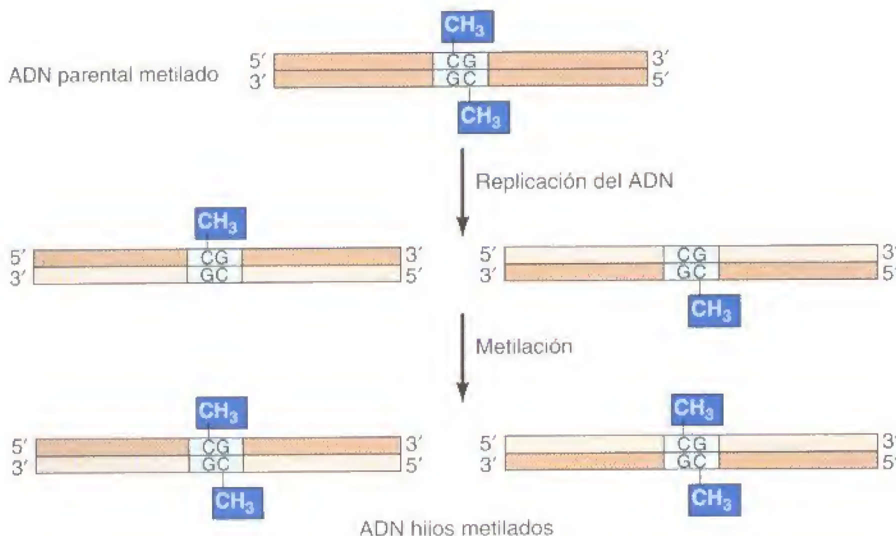



*Figura 6.38*
**Mantenimiento de los modelos o patrones de metilación.** En el ADN parental, ambas hebras se encuentran metiladas en las secuencias complementarias CpG. Después de la replicación, sólo la hebra parental de cada molécula hija se encuentra metilada. Las hebras hijas de nueva síntesis se metilan a continuación mediante una enzima que reconoce específicamente las secuencias CpG opuestas al sitio de metilación.

ARN funcional. La mayor parte del ARN de nueva síntesis ha de ser modificado de varias formas para convertirse en su forma funcional. Los ARNm bacterianos son una excepción; como fue expuesto al inicio de este capítulo, se utilizan mientras están siendo transcritos como moldes para la síntesis de proteínas. Sin embargos los transcritos primarios de los ARNr y ARNt han de pasar por una serie de pasos de maduración tanto en procariotas como en eucariotas. Los transcritos primarios de los ARNm eucarióticos son sometidos a grandes modificaciones, incluyendo la eliminación de intrones por corte y empalmado, antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma para servir de moldes en la síntesis de proteínas. La regulación de estos pasos de maduración proporciona un nivel adicional de control de la expresión génica, al igual que la regulación de la tasa de degradación de los ARNm.

## *Maduración de los ARNs ribosómicos y de transferencia*

Como era de esperar dado su papel crucial en la síntesis de proteínas, el procesamiento o maduración básicos de los ARNs ribosómicos y de transferencia es similar en procariotas y eucariotas. Los eucariotas poseen cuatro tipos de ARN ribosómico (véase Tabla 6.1), tres de los cuales (los ARNrs 28S, 18S y 5,8S) proceden del corte de un transcrito precursor único de gran tamaño, denominado **pre-ARNr** (Fig. 6.39). Los procariotas poseen tres ARNs ribosómicos (23S, 16S y 5S), que son equivalentes a los ARNr 28S, 18S y 5,8S de las células eucarióticas y son también obtenidos a partir de un pre-ARNr único. El único ARNr que no es apenas procesado es el ARNr 5S en eucariotas, que se transcribe a partir de un gen distinto.

Los pre-ARNr procarióticos y eucarióticos son madurados en varios pasos. El corte inicial del pre-ARNr bacteriano produce precursores separados para los tres ARNr; estos continúan su maduración por medio de escisiones secundarias hasta obtener sus productos finales. En las células eucarióticas el pre-ARNr sufre inicialmente un corte en un sitio adyacente al ARNr 5,8S en su extremo 5′, dando dos precursores que contienen el ARNr 18S y los ARNrs 28S y 5,8S, respectivamente. Escisiones posteriores dan lugar a los productos finales, tras lo que el ARNr 5.8S se une por medio de puentes de hidrógeno a la molécula 28S. Además de los procesos de corte, en la maduración del ARNr tiene lugar la adición de

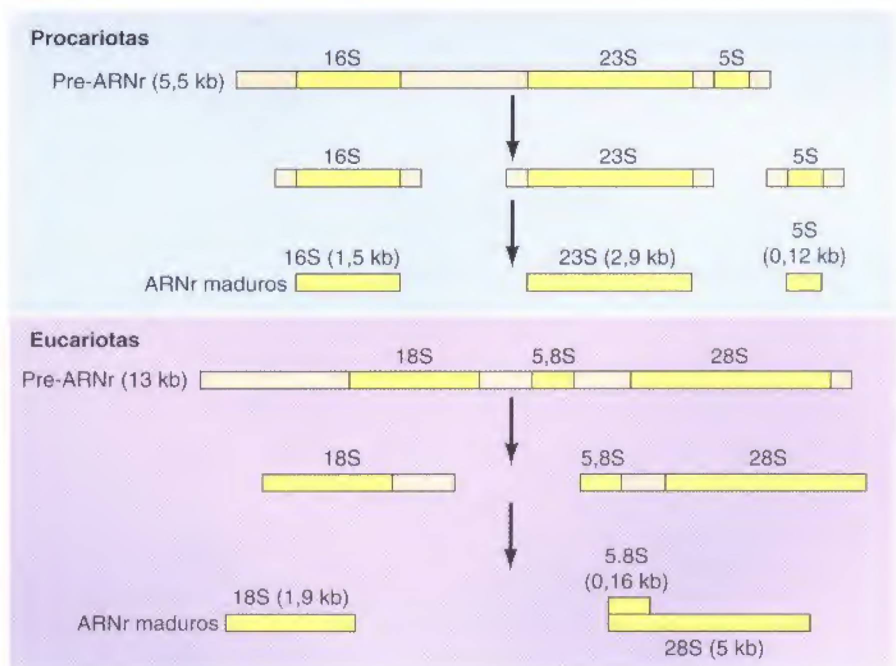



*Figura 6.39*
**Maduración del ARN ribosómico.** Las células procarióticas contienen tres ARNr (16S, 23S y 5S) formados por el corte de un tránscrito pre-ARNr. Las células eucarióticas (p. ej., las células humanas) contienen cuatro ARNr. Uno de ellos (el ARNr 5S) se transcribe de un gen diferente; los otros tres (18S, 28S y 5,8S) derivan de un pre-ARNr común. Después del corte, el ARNr 5,8S (que es exclusivo de eucariotas) se une al ARNr 28S mediante puentes de hidrógeno.

grupos metilo a las bases y residuos de azúcares de nucleótidos específicos. La maduración del ARNr tiene lugar en el interior del nucleolo de las células eucarióticas, y se estudiará en detalle en el Capítulo 8.

De igual forma que los ARNr, tanto los ARNt bacterianos como los eucarióticos son sintetizados como moléculas precursoras de gran tamaño (**pre-ARNt**), alguna de las cuales contiene las secuencias de varios ARNt individuales (Fig. 6.38). En bacterias algunos ARNt proceden de los transcritos pre-ARNr. El procesamiento del extremo 5'de los pre-ARNt se realiza por escisión por una enzima denominada **ARNasa P**, que es especialmente interesante porque es un prototipo de reacción catalizada por una enzima compuesta por ARN. La ARNasa P contiene ARN y moléculas proteínicas siendo ambos componentes necesarios para alcanzar el nivel de actividad máximo. En 1983 Sidney Altman y sus colaboradores demostraron que el componente ARN aislado de la ARNasa P es capaz por sí mismo de catalizar el corte de pre-ARNt. En estos experimentos se estableció que la ARNasa P es una **ribozima** —una enzima en la cual el componente catalítico está formado por ARN en vez de por proteínas.

El extremo 3' de los ARNt se forma por la acción de una ARNasa proteínica convencional, pero el procesamiento de este extremo de la molécula de ARN incluye también una actividad inusual: la adición de una secuencia terminal CCA. Todos los ARNt poseen la secuencia CCA en su extremo 3'. Esta secuencia es el sitio de unión de aminoácidos, por lo que es necesaria para el funcionamiento del ARNt durante la síntesis de proteínas. El CCA terminal está codificado en el ADN de algunos genes de ARNt, pero en otros no lo está y es añadido como un paso más en la maduración del ARNt por una enzima que reconoce y añade el CCA a los ARNt que carecen de esta secuencia.

Otro aspecto inusual de la maduración del ARNt es la amplia modificación que sufren las bases que forman las moléculas de ARNt. Aproximadamente el

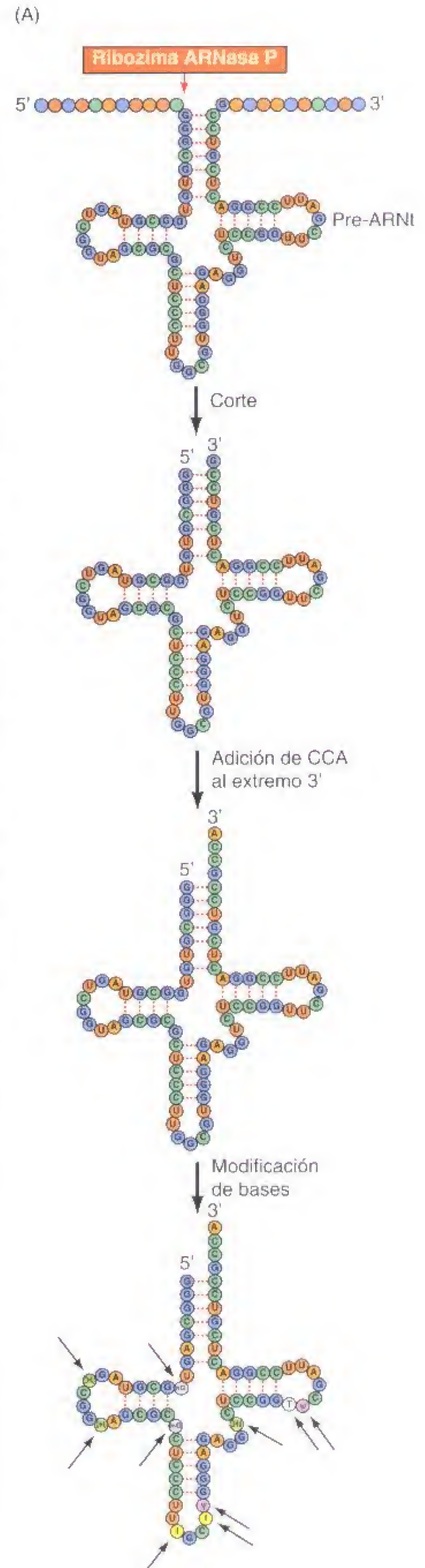
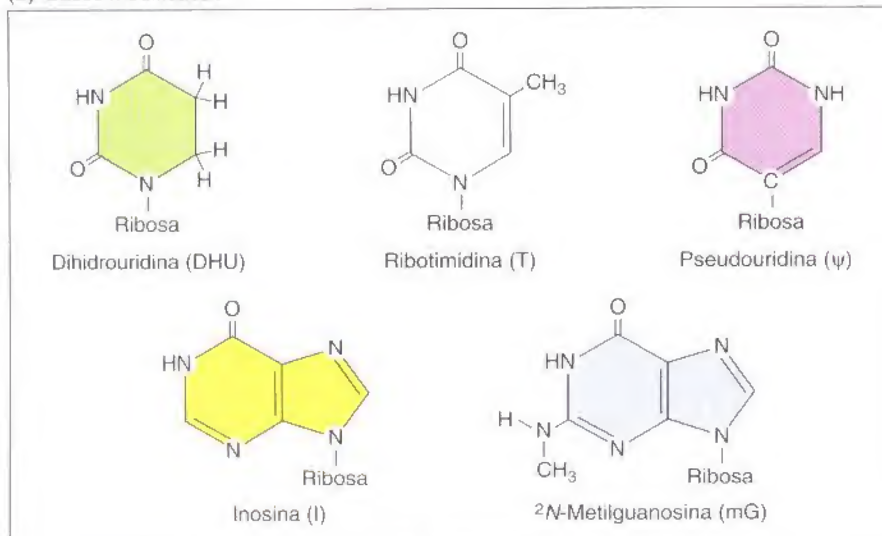



*Figura 6.40*
**Maduración del ARN de transferencia.** (A) Los ARNs de transferencia derivan de pre-ARNt, algunos de los cuales contienen varias moléculas independientes de ARNt. El corte en el extremo 5' del ARNt es catalizado por la ribozima ARNasa P; el corte en el extremo 3' es catalizado por una proteína RNAasa convencional. Posteriormente se añade una terminación CCA al extremo 3' de muchos ARNAt en una fase de maduración postranscripcional. Por último, se modifican algunas bases en determinadas posiciones dentro de la molécula de ARNt. En este ejemplo, los nucleósidos modificados son la dihidrouridina (DHU), la metilguanosina (mG), inosina (I), ribotimidina (T) y pseudouridina (ψ). (B) Estructura de las bases modificadas. La ribotimidina, dihidrouridina y pseudouridina se forman por modificación de las uridinas del ARNt. La inosina y la metilguanosina se forman por la modificación de guanosinas.



10% de las bases es alterada para dar una serie de nucleótidos modificados en posiciones específicas de las moléculas de ARNt (véase la Fig. 6.40). La función de la mayoría de estas bases modificadas se desconoce, pero algunas desempeñan un importante papel en la síntesis proteínica alterando las propiedades de apareamiento de bases de la molécula de ARNt (véase Cap. 7).

Algunos pre-ARNt, de igual forma que los pre-ARNr de determinados organismos, contienen intrones que son eliminados por corte y empalme (o *splicing*). A diferencia de otras reacciones de corte y empalme, que (como se verá en la próxima sección) implican la actividad de ARNs catalíticos, el *splicing* de los ARNt está mediado por enzimas proteicas convencionales. Una endonucleasa escinde el pre-ARNt en los puntos de corte para escindir el intrón, seguido de la unión de los exones para formar una molécula de ARNt madura.

## *Maduración del ARNm en eucariotas*

A diferencia de lo que ocurre con la maduración de los ARNs ribosómico y de transferencia, la maduración del ARN mensajero presenta importantes diferencias entre células procarióticas y eucarióticas. En las bacterias los ribosomas tienen un acceso inmediato al ARNm y la traducción comienza en el ARNm naciente mientras está todavía en marcha la transcripción. En eucariotas el ARNm sintetizado en el núcleo ha de ser transportado al citoplasma antes de ser usado como molde en la síntesis de proteínas. Además los productos iniciales de la transcricpión eucariótica (**pre-ARNms**) son ampliamente modificados antes de salir del núcleo. El procesamiento o maduración del pre-ARNm incluye la modificación de ambos extremos de la molécula, así como la eliminación de los intrones de su interior (Fig. 6.41). En lugar de tener lugar como sucesos

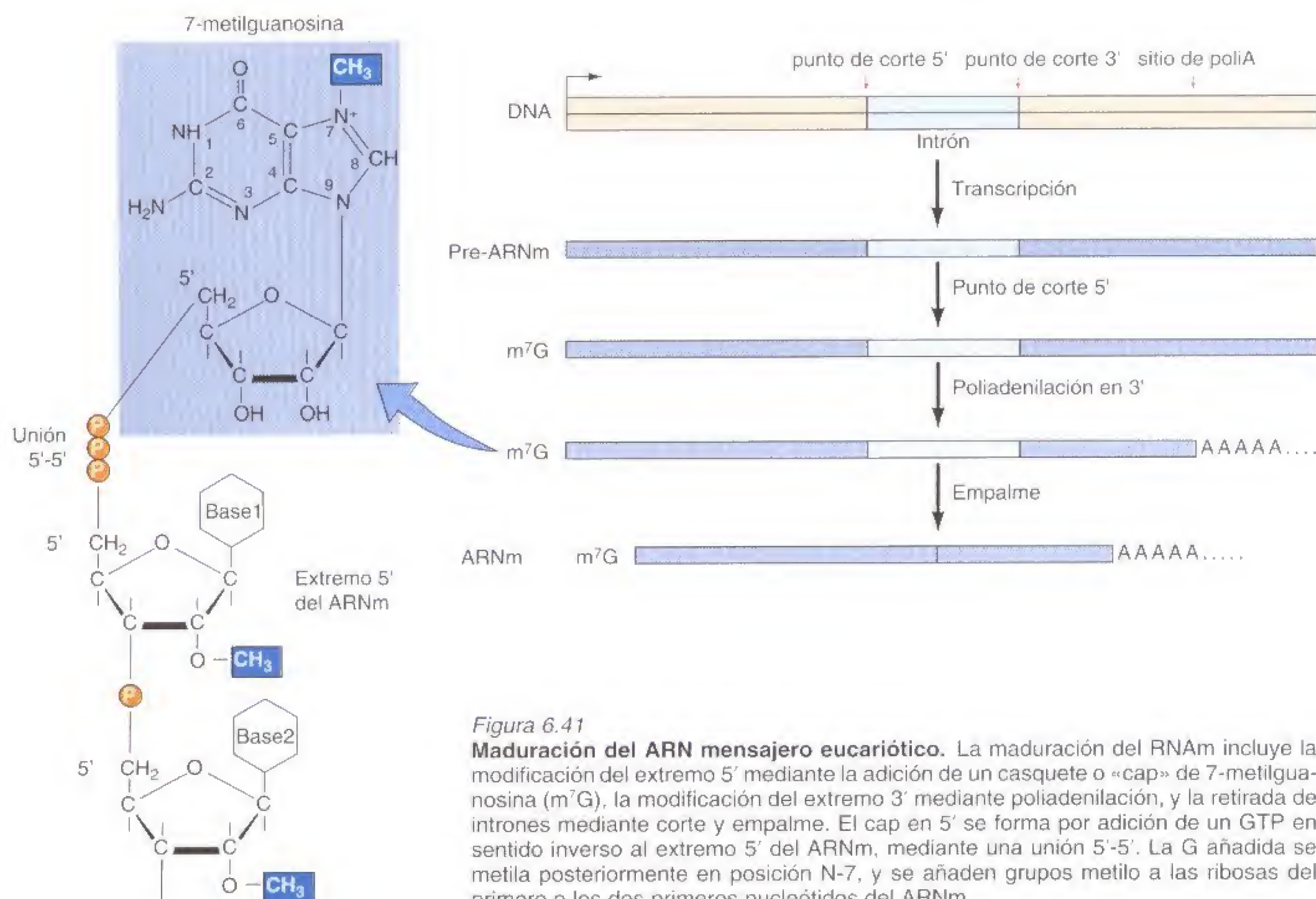



*Figura 6.41*
**Maduración del ARN mensajero eucariótico.** La maduración del RNAm incluye la modificación del extremo 5′ mediante la adición de un casquete o «cap» de 7-metilguanosina ($m^7G$), la modificación del extremo 3′ mediante poliadenilación, y la retirada de intrones mediante corte y empalme. El cap en 5′ se forma por adición de un GTP en sentido inverso al extremo 5′ del ARNm, mediante una unión 5′-5′. La G añadida se metila posteriormente en posición N-7, y se añaden grupos metilo a las ribosas del primero o los dos primeros nucleótidos del ARNm.

independientes después de la síntesis del pre-ARNm, estas reacciones de maduración están acopladas a la transcripción, de modo que la síntesis del ARNm y la maduración constituyen pasos estrechamente coordinados en la expresión génica. El dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II juega un papel clave en la coordinación de estos procesos, sirviendo como sitio de unión para los complejos enzimáticos implicados en la maduración del ARNm. La asociación de estas enzimas de maduración con el CTD de la polimerasa II es responsable de su especificidad en el procesamiento de ARNm; las polimerasas I y II carecen de CTD, de modo que sus productos no son procesados por los mismos complejos enzimáticos.

El primer paso en la maduración del ARNm es la modificación del extremo 5' del tránscrito mediante la adición de una estructura denominada **caperuza o cap de 7-metilguanosina**. Las enzimas responsables de la formación de esta caperuza son reclutadas al CTD fosforilado siguiendo la iniciación de la transcripción, y la caperuza es añadida tras la transcripción de los primeros 20-30 nucleótidos de ARN. La formación de la caperuza es iniciada por la adición de una molécula de GTP en orientación inversa al nucleótido 5' terminal del ARN. A continuación se añaden grupos metilo a este residuo de G y a las formas de ribosa de uno o dos nucleótidos 5' de la cadena de ARN. La caperuza en 5' estabiliza el ARN, además de alinear los ARNm eucarióticos sobre el ribosoma durante la traducción (Capítulo 7).

El extremo 3' de la mayoría de los ARNm eucarióticos se forma no por la terminación de la transcripción, sino por el corte del transcrito primario y la adición de una **cola de poli-A** —una reacción de la maduración denominada **poliadenilación** (Fig. 6.42)—. Las señales para la poliadenilación incluyen diversas secuencias. La más conservada de todas ellas en células animales es el hexanucleótido AAUAAA, que se localiza de 10 a 30 nucleótidos corriente arriba del sitio de poliadenilación. Otras secuencias menos conservadas que contribuyen a la señalización de la poliadenilación se encuentran tanto corriente arriba como corriente abajo de AAUAAA. Estas secuencias son reconocidas por un grupo de proteínas, que incluyen una endonucleasa que corta la cadena de ARN y una poli-A polimerasa que añade una cola de unos 200 nucleótidos al transcrito de ARN. Estas enzimas procesadoras están asociadas con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II, y pueden viajar con la polimerasa desde el punto de iniciación. La escisión y poliadenilación señaliza la finalización de la transcripción, que habitualmente ocurre varios cientos de nucleótidos corriente abajo del sitio de adición de la cola de poli-A.

La mayoría de los ARNm eucarióticos está poliadenilada, y se sabe que las colas de poli-A regulan la traducción y la estabilidad del ARNm. La poliadenilación tiene también un importante papel regulador en fases iniciales del desarrollo, donde cambios en la longitud de las colas de poli-A controlan la traducción

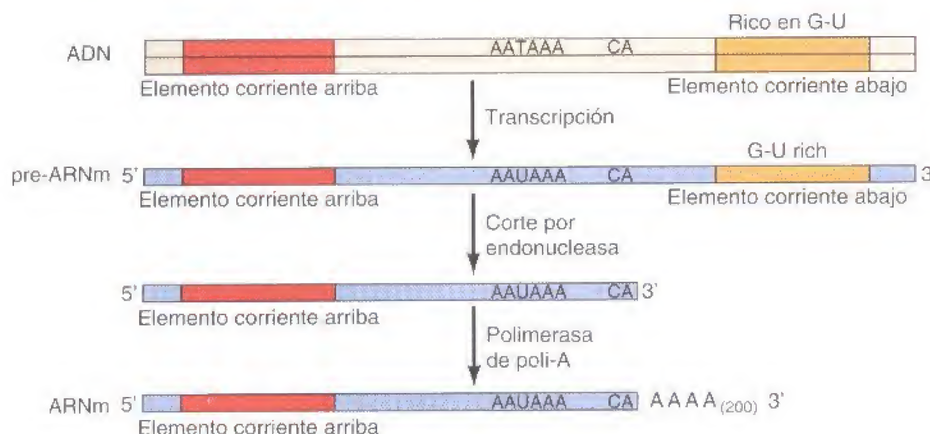



*Figura 6.42*
**Formación del extremo 3' del ARNm eucariótico.** Las señales de poliadenilación en células de mamíferos consisten en un hexanucleótido AAUAAA añadido a elementos corriente arriba y abajo (ricos en G-U). Una endonucleasa corta el pre-ARNm a unos 10 a 30 nucleótidos corriente abajo del AAUAAA, habitualmente en una secuencia CA. Posteriormente la polimerasa poli-A añade al extremo 3' del ARNm la cola de poli-A, que está formada por unos 200 residuos de A.

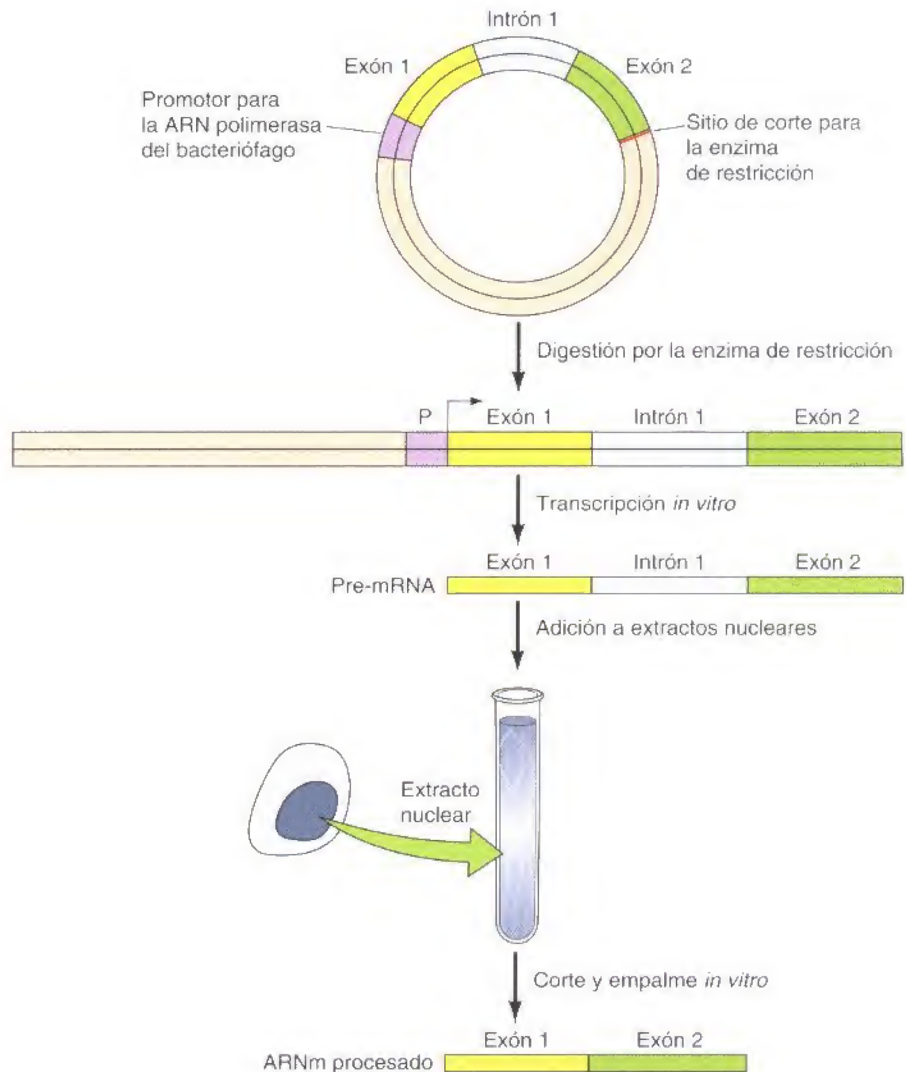



*Figura 6.43*
**Corte y empalme *in vitro*.** Se procede a la clonación de un gen que contiene un intrón y está situado corriente abajo de un promotor (P), el cual es reconocido por la RNA polimerasa de un bacteriófago. El plásmido es digerido con una enzima de restricción que realiza un corte en el extremo 3′ del gen insertado para conseguir una molécula de ADN lineal. Este ADN se transcribe *in vitro* con la polimerasa del bacteriófago, obteniéndose un pre-ARNm. Las reacciones de corte y empalme pueden ser estudiadas añadiendo *in vitro* este pre-ARNm a extractos nucleares de células de mamíferos.

del ARNm. Por ejemplo, muchos ARNm están almacenados en óvulos no fertilizados en una forma no traducida con colas cortas de poli-A (habitualmente de 30 a 50 nucleótidos de longitud). La fertilización estimula el alargamiento de las colas de poli-A de los ARNm almacenados, lo cual a su vez activa su traducción y la síntesis de las proteínas necesarias para el desarrollo embrionario.

La modificación más llamativa de los pre-ARNm es la eliminación de intrones por el procedimiento de corte y empalme o *splicing*. Como fue expuesto en el Capítulo 4, las secuencias codificantes de la mayoría de los genes eucarióticos están interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones) que son escindidas de forma precisa del ARNm maduro. La mayor parte de los genes contienen múltiples intrones, que habitualmente suponen hasta el 90% del total de las secuencias de que consta el pre-ARN. El descubrimiento inesperado de los intrones en 1977 generó un activo esfuerzo investigador dirigido a la compresión de los mecanismos de corte y empalme, que se suponía deberían ser altamente específicos para producir ARNms funcionales. Estudios posteriores de los fenómenos de corte y empalme no sólo han ilustrado nuevos mecanismos de regulación génica, sino que también han revelado la actividad catalítica de ciertas moléculas de ARN.

## *Mecanismos de corte y empalme o* splicing

La clave para entender los mecanismos de corte y empalme fue el desarrollo de sistemas *in vitro* que llevaran a cabo de forma eficiente la reacción (Fig. 6.41).

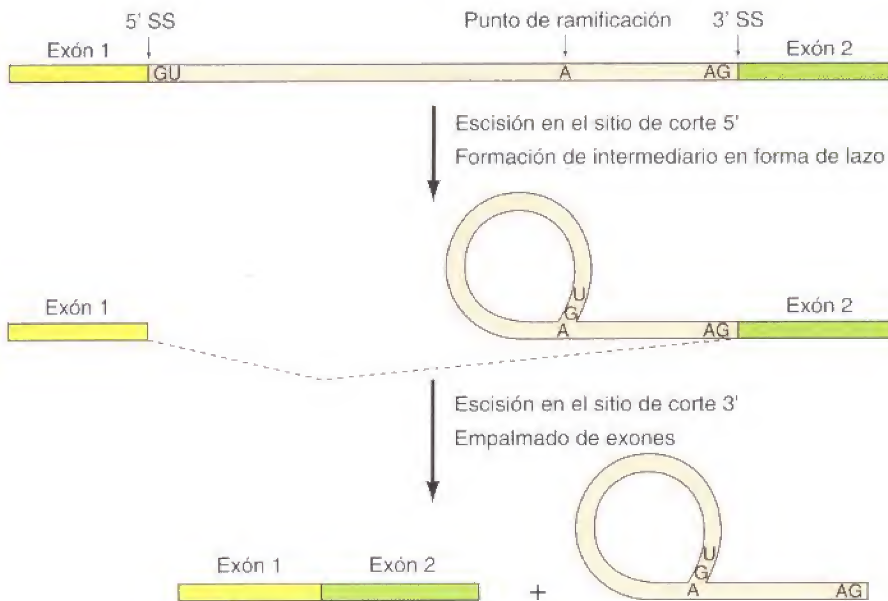


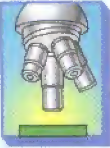

*Figura 6.44*
**Corte y empalme del pre-ARNm.** El proceso de corte y empalme se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso consiste en una escisión en el sitio de corte 5′ (SS) y la unión del extremo 5′ del intrón con una A contenida en el intrón (punto de ramificación). Con esta reacción se consigue un intermediario en forma de lazo, dentro del cual el intrón forma un bucle. El segundo paso es la escisión en el sitio de corte 3′ y el empalmado simultáneo de los exones, obteniéndose por escisión del intrón como una estructura en forma de lazo.

Los pre-ARNm fueron sintetizados *in vitro* por medio de la clonación de genes estructurales (con sus intrones) adyacentes a promotores de la ARN polimerasa de un bacteriófago en vectores plasmídicos, que pueden ser obtenidos en grandes cantidades. La transcripción de estos plásmidos fue utilizada para obtener un gran número de pre-ARNm que tras ser añadidos a extractos nucleares de células animales fueron cortados y empalmados de forma correcta. El uso de dichos sistemas *in vitro* ha permitido, como en el caso de la transcripción, analizar los fenómenos de corte y empalme con mucho mayor detalle de lo que hubiera sido posible utilizando células intactas.

El análisis de los productos de la reacción y de los intermediarios formados *in vitro* reveló que el corte y empalmado del pre-ARNm tiene lugar en dos etapas (Fig. 6.44). En primer lugar el pre-ARNm es cortado en el sitio de corte y empalme 5′, y el extremo 5′ del intrón se une a un nucleótido de adenina del intrón (cerca de su extremo 3′). En este paso se forma un vínculo inusual entre el extremo 5′del intrón y el grupo hidroxilo 2′ de la adenina. El intermediario resultante es una estructura en lazo, en la que el intrón forma un bucle. El segundo paso tiene lugar con el corte en 3′ y la unión simultánea de los dos exones. El intrón es escindido como una estructura en forma de lazo que es posteriormente degradada en el núcleo de las células intactas.

Estas reacciones definen tres secuencias críticas en los ARNm: la secuencia en el sitio de corte 5′, la secuencia en el sitio de corte 3′ y las secuencias en el punto o sitio de ramificación (el punto en el que se une el extremo 5′ del intrón para formar la estructura en forma de lazo) (véase Fig. 6.44). Los pre-ARNm contienen secuencias consenso similares en cada una de estas tres posiciones, permitiendo al complejo de corte y empalme reconocer a los pre-ARNm y llevar a cabo las reacciones de corte y unión implicadas en el proceso.

El análisis bioquímico de extractos nucleares ha revelado que el *splicing* tiene lugar en grandes complejos, denominados **espliceosomas**, compuestos



# Experimento clave

## Descubrimiento del RNPsn

**Los anticuerpos frente a ARNs pequeños nucleares que forman complejos con proteínas son producidos por pacientes con lupus eritematoso sistémico**

Michael R. Lerner y Joan A. Steitz

Yale University, New Haven, Connecticut

*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979, Volumen 76, págs 5495-5499*



Joan Steitz

### Contexto

El descubrimiento de los intrones en 1977 implicaba que una reacción de maduración totalmente novedosa era requerida para producir ARNm en las células eucarióticas. Los intrones debían ser escindidos con precisión del pre-ARNm, seguido de la unión de los exones para dar lugar a una molécula de ARNm madura. Dada la naturaleza inesperada del *splicing* del ARNm, comprender el mecanismo de la reacción de corte y empalme cautivó la atención de muchos biólogos moleculares. Uno de los principales pasos en la elucidación de este mecanismo fue el descubrimiento de los RNPsn y su implicación en el *splicing* del pre-ARNm.

Los ARNs pequeños nucleares fueron identificados por primera vez en las células eucarióticas a finales de los años 60. Sin embargo, la función de los ARNsn permanecía desconocida. En este trabajo de 1979, Michael Lerner y Joan Steitz demostraron que los ARNsn más abundantes estaban presentes formando complejos ARN-proteína denominados RNPsn. Además, proporcionaron la primera sugerencia de que estos complejos ARN-proteína podrían funcionar en el *splicing* del pre-ARNm. Esta identificación de RNPsn llevó a una variedad de experimentos que confirmaron sus papeles y elucidaron el mecanismo por el que tiene lugar el *splicing* del pre-ARNm.

### Experimentos

La identificación de los RNPsn se basó en el uso de antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune en la que los pacientes producen anticuerpos frente a constituyentes celulares normales. Muchos de los anticuerpos producidos por pacientes de lupus eritematoso sistémico están dirigidos frente a componentes del núcleo, incluyendo ADN, ARN e histonas. El descubrimiento de las RNPsn surgió de estudios en los que Lerner y Steitz trataron de caracterizar dos antígenos, denominados ribonucleoproteína (RNP) y Sm, que eran reconocidos por anticuerpos de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Datos indirectos sugirieron que RNP consistía tanto de proteína como de ARN, como su nombre indica, pero ni RNP ni Sm habían sido caracterizados a nivel molecular.




Inmunoprecipitación de ARNsn con antisuero de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Carril 1, anti-Sm; carril 2, suero control normal; carril 3, antisuero que reconoce principalmente el antígeno RNP; carril 4, anti-RNP. Existe un ARN no específico denominado X en todos los inmunoprecipitados, incluyendo el control.

Para identificar los posibles componentes de ARN en los antígenos RNP y Sm, ARNs nucleares de células de ratón fueron marcadas con $^{32}P$ e inmunoprecipitadas con antisuero de diferentes pacientes de lupus eritematoso sistémico (véase Fig. 3.30). Se encontraron seis especies específicas de ARNsn que eran inmunoprecipitadas selectivamente con antisuero de diferentes pacientes, pero no por suero de un paciente control normal (ver figura). El suero anti-Sm inmunoprecipitó a los seis de estos ARNsn, que se designaron U1a, U1b, U2, U4, U5, y U6. Los ARNsn inmunoprecipitados fueron caracterizados mediante el análisis de secuencias, que demostró que U1a, U1b y U2 eran idénticos al ARNsn más abundante previamente descrito en el núcleo mamífero, donde U1a y U1b representan variantes de secuencia de una sola especie de ARNsn U1 presente en células humanas. Por el contrario, los ARNsn U4, U5 y U6 fueron identificados por primera vez por Lerner y Steitz en estos experimentos.

La inmunoprecipitación de estos ARNsn demostró que eran componentes de complejos ARN-proteína. Se había demostrado previamente que el suero anti-Sm, que inmunoprecipitó los seis ARNsn estaba dirigido frente a un antígeno proteico. De forma similar, se sabía que la proteína era necesaria para el reconocimiento antigénico por parte del suero anti-RNP. Es más, Lerner y

### *Descubrimiento del RNPsn* (continuación)

Steitz demostraron que ninguno de los ARNsn podían ser inmunoprecipitados si la proteína se eliminaba primero mediante una extracción del ARN con fenol. Más análisis de las células en las que se habían marcado las proteínas con $^{35}$S-metionina identificó a siete proteínas nucleares prominentes que fueron inmunoprecipitadas junto con los ARNsn con los sueros anti-Sm y anti-RNP. Así, estos datos indicaban que cada uno de los seis ARNsn estaba presente en un complejo RNPsn con proteínas nucleares específicas.

### Impacto

El descubrimiento de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que eran reconocidos por antisueros específicos abrió un nuevo enfoque para el estudio de la función del ARNsn. Lerner y Steitz indicaron que un posible papel «muy intrigante» para los ARNsn podría ser en el *splicing* de pre-ARNm, y señalizaron que las secuencias próximas al extremo 5′ del ARNsn U1 eran complementarias a los puntos de corte y empalme.

Steitz y sus colaboradores continuaron con una serie de experimentos que estableció la implicación crítica de las RNPsn en el *splicing*. Estos estudios incluyeron un análisis de secuencia más extenso que demostraba la complementariedad de las secuencias conservadas en 5′ del ARNsn U1 a las secuencias consenso de sitios de corte y empalme en 5′, sugiriendo que U1 funcionaba en el reconocimiento del sitio de corte y empalme en 5′. Adicionalmente, el antisuero frente a RNPsn se empleó para demostrar que U1 era necesaria para el *splicing* de pre-ARNm tanto en núcleos aislados como en extractos de corte y empalme *in vitro*. Más estudios han seguido para demostrar que los ARNsn por sí mismos juegan papeles críticos no sólo en la identificación de los sitios de corte y empalme, sino también como catalizadores de la reacción de *splicing*. El descubrimiento inicial de que los ARNsn eran componentes de las RNPsn que podían ser reconocidos por antisueros específicos abrió la puerta a la comprensión del mecanismo de procesamiento del pre-ARNm.

de proteínas y ARNs. Los ARNs que forman parte de los espliceosomas son cinco tipos de **ARN nuclear de pequeño tamaño** (**ARNsn**) denominados U1, U2, U4, U5 Y U6. Estos snARNs, que tienen un tamaño de entre 50 y 200 nucleótidos, forman un complejo con entre seis y diez moléculas proteínicas para dar **partículas pequeñas de rinonucleoproteínas nucleares** (**RNPsn**), que tienen un papel central en el proceso de *splicing*. Las snRNPs U1, U2 y U5 contienen cada una una molécula única de ARNsn, mientras que las RNPsn U4 y U6 están unidas entre sí formando una única RNPsn.

El primer paso en la formación del espliceosoma es la unión de la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ del pre-ARNm (Fig. 6.45). Este reconocimiento de los sitios de corte 5′ se realiza por medio del apareamiento de bases entre la secuencia del consenso del sitio de corte 5′ y una secuencia complementaria en el extremo 5′ del ARNsn U1 (Fig. 6.46). Posteriormente la RNPsn U2 se une al punto de ramificación por apareamiento complementario de bases. Un complejo preformado compuesto de las RNPsn U4/U6 y U5 se incorpora al espliceosoma, estando la U5 unida a secuencias corriente arriba del sitio de corte 5′.

La reacción de corte y empalme se acompaña de reordenamientos en los ARNsn. Antes del primer paso de la reacción (la formación del intermediario con estructura de lazo, véase Fig. 6.44), la U6 se disocia de la U4 y desplaza a la U1 en el sitio de corte 5′. Entonces la U5 se une a determinadas secuencias del sitio de corte 3′, lo cual se sigue del corte del intrón y del empalme de los exones.

Los ARNsn no sólo reconocen las secuencias consenso en los sitios de ramificación y los sitios de corte en los pre-ARNs, sino que también catalizan la reacción de corte y empalme de forma directa. La función catalítica del ARN en el *splicing* se demostró con el descubrimiento de que determinados ARNs eran capaces de **autoempalmarse** (*self-splicing*), esto es, eran capaces de catalizar la eliminación de sus propios intrones en ausencia de otras proteínas o ARNs. La reacción de autoempalme fue descrita inicialmente por Tom Cech y sus colaboradores en estudios del ARNt 28S del protozoo *Tetrahymena*. Este ARN contiene un intrón de aproximadamente 400 pares de bases que es eliminado de forma precisa tras incubar el pre-ARN en ausencia de proteínas. Estudios posteriores han revelado que el corte y empalme es catalizado por el intrón, que actúa como una ribozima

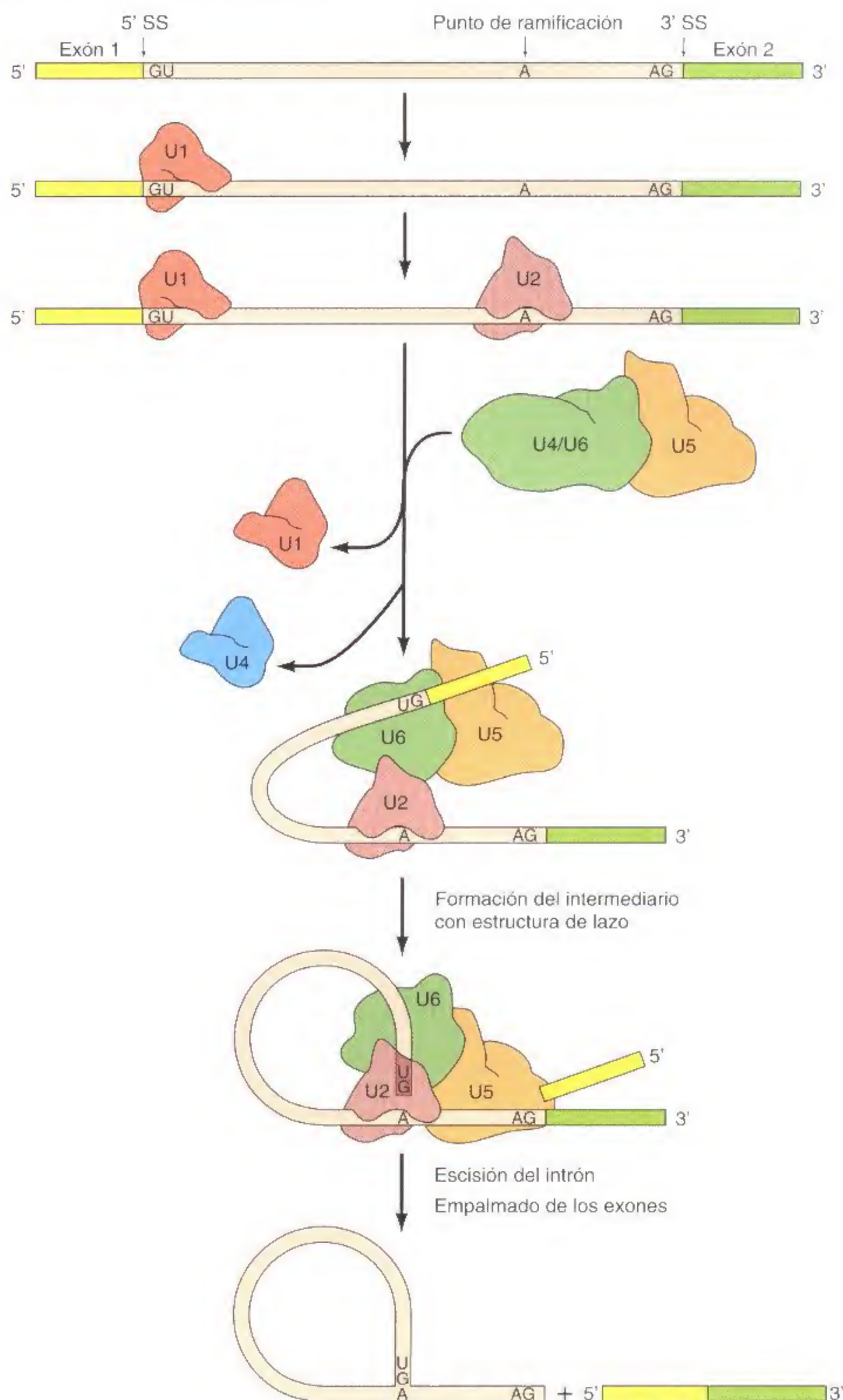



*Figura 6.45*
**Ensamblaje del espliceosoma.** El primer paso en el ensamblaje del espliceosoma es la unión del RNPsn U1 al sitio de corte 5' (SS), seguido de la unión del RNPsn U2 al punto de ramificación. A continuación se incorpora al espliceosoma un complejo preformado que contiene las RNPsn U4/U6 y U5. La U5 se une a secuencias corriente arriba del punto de corte 5′, y la U6 se separa de la U4 y desplaza a la U1 antes de formarse el intermediario con estructura de lazo. La U5 se une entonces al sitio de corte 3′, y posteriormente se corta el intrón y se empalman los exones.

para dirigir su propia escisión de la molécula de pre-ARN. El descubrimiento del autoempalme en el ARNr de la *Tetrahymena*, junto con los estudios acerca de la ARNasa P ya mencionados, han proporcionado la primera demostración de la actividad catalítica del ARN.

Ensayos posteriores han demostrado fenómenos de autoempalme en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. Los ARNs con actividad autoempalmante se

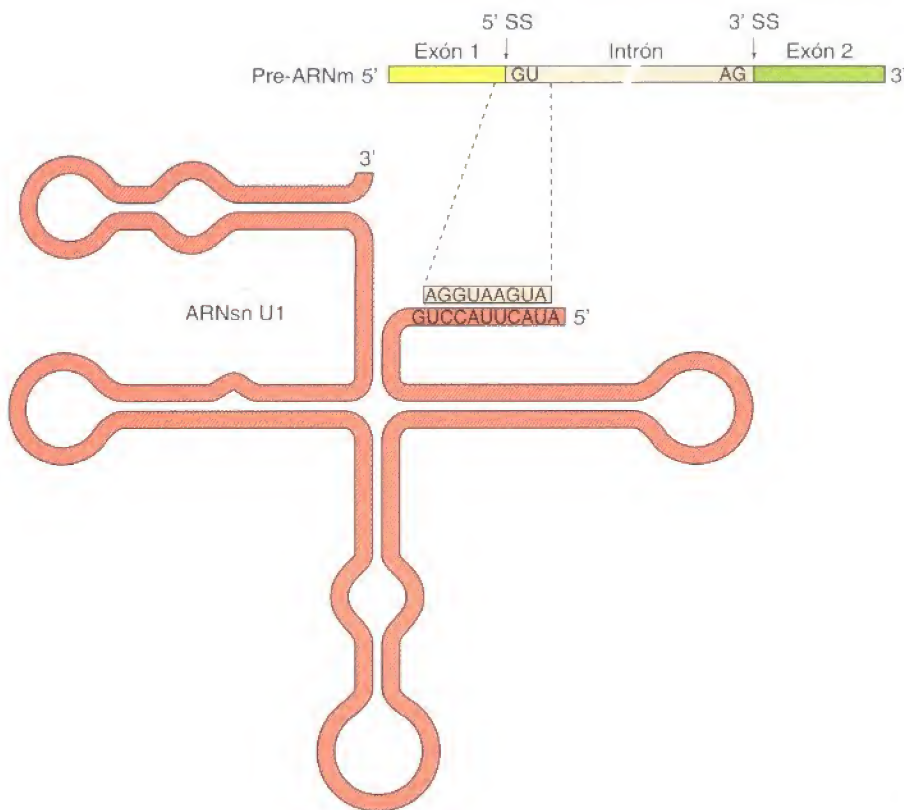
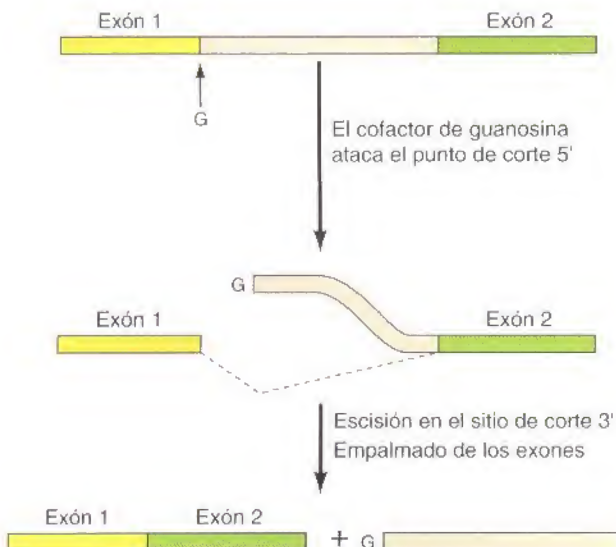
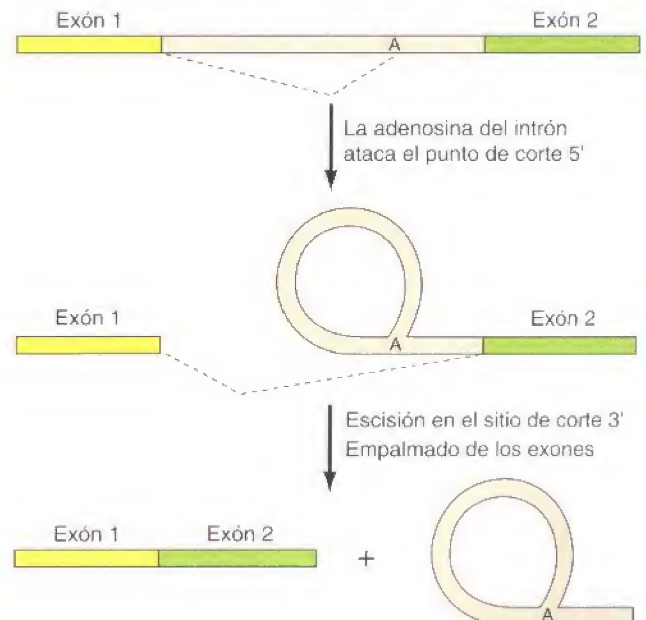



*Figura 6.46*
**Unión del ARNsn U1 al sitio de corte 5′.** El extremo 5′ del ARNsn U1 se une a las secuencias consenso de los sitios de corte 5′ mediante el apareamiento complementario de bases.

dividen en clases según su mecanismo de acción (Fig. 6.47). El primer paso en el corte y empalme de los intrones de tipo I (p. ej., el pre-ARN de la *Tetrahymena*) es la escisión en el sitio de corte 5′ mediado por un cofactor de guanosina. El extremo 3′ del exón liberado reacciona con el sitio de corte 3′ para escindir el intrón como un ARN lineal. Sin embargo, las reacciones de autoempalme de los intrones de tipo II (p. ej., algunos pre-ARNs mitocondriales) son muy similares al corte y empalme nuclear del pre-ARNm, en el que la escisión del sitio de corte 5′ se sigue de la formación de una estructura con forma de lazo en el intrón, que luego es escindido.

*Figura 6.47*
**Intrones autoempalmantes (*self-splicing*).** Los intrones autoempalmantes de los grupos I y II se distinguen por sus mecanismos de actuación. En los intrones del grupo I, el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ gracias a la reacción con un cofactor de guanosina. El resultado es un intermediario lineal que tiene una G añadida al extremo 5′ del intrón. En los intrones del grupo II (como en el corte y empalme del pre-ARNm) el primer paso es la escisión en el punto de corte 5′ por reacción con una A del interior del intrón, dando lugar a un intermediario con estructura de lazo. En ambos casos el segundo paso es la escisión del sitio de corte 3′ y el simultáneo empalmado de los exones.



La similitud entre el corte y empalme del pre-ARNm mediado por espliceosomas y el autoempalme de los intrones de tipo II sugirió que los componentes catalíticamente activos del espliceosoma son ARNs en vez de proteínas. Esta similitud sugirió en particular que el corte y empalme del pre-ARNm estaba catalizado por los ARNsn del espliceosoma, lo cual se ha visto firmemente apoyado en posteriores ensayos; los ARNsn U2, U5 y U6 han sido identificados como los elementos catalíticos del espliceosoma. Por lo tanto, el corte y empalme del pre-ARNm está considerada una reacción basada en el ARN, catalizada por ARNsn del espliceosoma que actúan de forma análoga a los intrones autoempalmantes de tipo II. Sin embargo, en el interior de la célula, los componentes proteicos de las RNPsn también son necesarios, y participan tanto en el ensamblaje del espliceosoma como en la reacción de corte y empalme.

Un cierto número de factores proteicos de *splicing* que no son componentes de las RNPsn, también juegan papeles críticos en el ensamblaje del espliceosoma, especialmente en la identificación de los sitios correctos de corte y empalme en los pre-ARNm (Fig. 6.48). Los pre-ARNm de mamíferos generalmente contienen múltiples exones cortos (una media de 150 nucleótidos en humanos) separados por intrones mucho más largos (una media de 3.500 nucleótidos). Los intrones frecuentemente contienen muchas secuencias parecidas a los puntos de corte y empalme, de modo que la maquinaria de *splicing* debe ser capaz de identificar las dianas 5′ y 3′ de corte y empalme apropiadas en los límites intrón/exón para producir una ARNm funcional. Los factores de corte y empalme sirven para dirigir al espliceosoma a la diana de corte y empalme correcta, mediante la unión a secuencias específicas de ARN en los exones, y reclutando a continuación las RNPsn U1 y U2 a los sitios apropiados del pre-ARNm, mediante interacciones proteína-proteína. Además, los factores de corte y empalme acoplan el *splicing* con la transcripción mediante la asociación con el CTD fosforilado de la ARN polimerasa II. Este anclaje de la maquinaria de *splicing* con la ARN polimerasa se cree que es importante para asegurar que los exones se unan en el orden correcto a medida que se sintetiza el pre-ARNm.

## *Corte y empalme alternativo*

El papel central de los mecanismos de corte y empalme en la maduración del pre-ARNm abre la posibilidad de regular la expresión génica por medio del control de la maquinaria celular que los lleva a cabo. Dado que muchos pre-ARNm contienen múltiples intrones, pueden producirse distintos ARNm partiendo del mismo gen combinando los sitios de corte 5′ y 3′. La posibilidad de combinar los exones aporta un nuevo modo de controlar la expresión génica generando múltiples ARNm (y por lo tanto múltiples proteínas) a partir del mismo pre-ARNm. Este proceso, denominado **corte y empalme alternativo** (o *splicing* alternativo) ocurre de forma habitual en los genes de eucariotas superiores. Por ejemplo, se estima que el corte y empalme alternativo puede resultar en la producción de tres o más ARNm de un gen promedio de mamífero, incrementando considerablemente la diversidad de proteínas que pueden codificarse por los 30.00-40.000 genes estimados de los genomas de mamíferos. Puesto que los patrones de corte y empalme alternativos pueden variar entre los distintos tejidos, el corte y empalme alternativo proporciona un importante mecanismo de regulación de la expresión génica con especificidad tisular y del desarrollo.

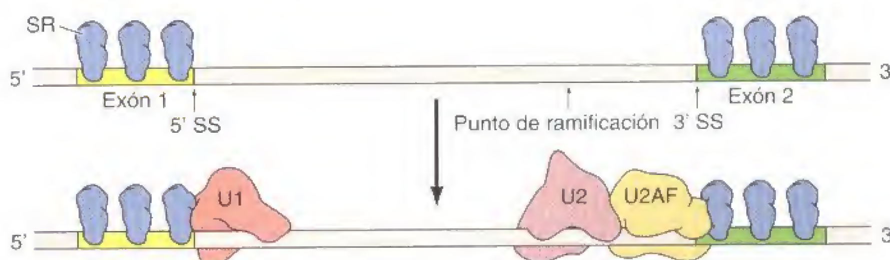



*Figura 6.48*
**Papel de los factores de corte y empalme en el ensamblaje del espliceosoma.** Los factores de corte y empalme (proteínas SR) se unen a secuencias específicas en los exones. Las proteínas SR reclutan la RNPsn U1 al sitio de corte 5′ y un factor de corte y empalme adicional (U2AF) al punto de corte 3′. A continuación U2AF recluta a RNPsn U2 al punto de ramificación.

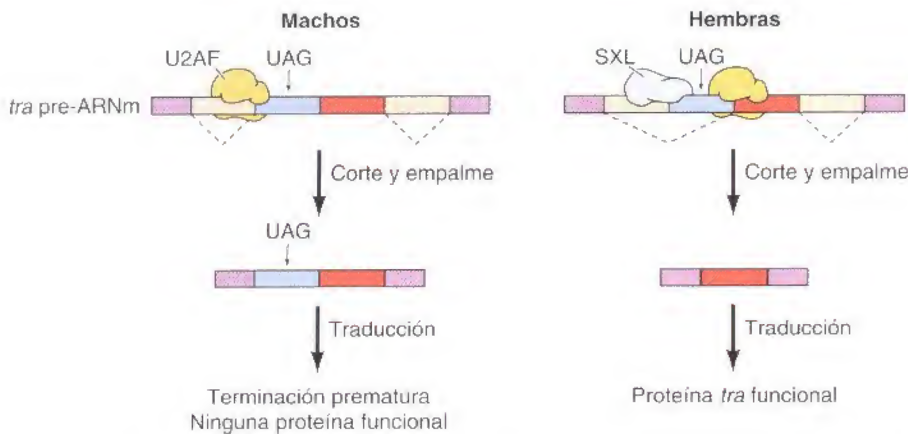



*Figura 6.49*
**Corte y empalme alternativo en la determinación sexual de *Drosophila***
El corte y empalme alternativo del ARNm *transformador (tra)* está regulado por la proteína SXL, que sólo se expresa en las moscas hembra. En los machos, el primer exón del ARNm *tra* se une a un punto de corte y empalme 3' que da lugar a un segundo exón que contiene un codón de terminación para la traducción, de modo que no se expresa ninguna proteína *tra*. En las hembras, la unión de la proteína SXL bloquea la unión de U2AF a este punto de corte y empalme 3', resultando en el uso de un sitio alternativo más adelante en el exón 2. Este punto de corte y empalme alternativo en 3' se encuentra después del codón de terminación para la traducción, de modo que el ARNm expresado en las hembras dirige la síntesis de una proteína *tra* funcional.

Un ejemplo bien estudiado del procesamiento alternativo específico de tejidos lo proporciona la determinación del sexo en *Drosophila*, donde el corte y empalme alternativo del mismo pre-ARNm determina si la mosca es macho o hembra (Fig. 6.49). El corte y empalme alternativo del pre-ARNm de un gen denominado *transformador* está controlado por una proteína (SXL) que sólo se expresa en las moscas hembra. El pre-ARNm *transformador* posee tres exones, pero un segundo exón distinto entre ambos sexos, se incorpora en el ARNm como resultado del uso de puntos de corte y empalme alternativos en 3'. En los machos, el exón 1 se une al punto de corte y empalme más 3', que se selecciona mediante la unión del factor de corte y empalme U2AF a secuencias del exón 2. En las hembras, la proteína SCL se une a este punto del exón 2, bloqueando la unión de U2AF. En consecuencia, el punto de corte y empalme más 3' es ignorado en las hembras, y el exón 1 se une a un punto de corte y empalme 3' alternativo que se encuentra más adelante. Las secuencias del exón 2 incluídas en el ARNm *transformador* contienen un codón de terminación de la traducción, de modo que no se produce ninguna proteína. Este codón de terminación no está incluido en el ARNm femenino, de modo que las moscas hembra expresan la proteína *transformadora* funcional, que actúa como un regulador clave en la determinación del sexo.

El corte y empalme alternativo del *transformador* ilustra la acción de un represor (la proteína SXL) que funciona bloqueando la unión de un factor de corte y empalme (U2AF). En otros casos, el corte y empalme alternativo está controlado por activadores que reclutan factores de corte y empalme que actúan sobre sitios que de otro modo no serían reconocidos. Así, existen múltiples mecanismos que pueden regular el corte y empalme alternativo, y las variaciones en el corte y empalme alternativo constituyen una gran contribución a la diversidad de las proteínas expresadas durante el desarrollo y la diferenciación.

## *Corrección del ARN*

La **correción del ARN** (o en inglés *RNA editing*) se define como los procesos de maduración (aparte del corte y empalme) que alteran las secuencias codificadoras de proteínas de algunos ARNm. Esta inesperada forma de maduración de ARN fue descrita por primera vez en ARNm mitocondriales de tripanosomas, en los que se añadían y eliminaban residuos de U en múltiples sitios a lo largo de la molécula. Más recientemente, la corrección ha sido descrita en ARNm mitocondriales de otros organismos, ARNm cloroplásticos de plantas superiores y ARNm nucleares de genes animales.

La corrección de ARNms nucleares animales, así como de ARN mitocondriales y cloroplásticos de plantas superiores, implica cambios de bases únicos como resultado de reacciones de modificación de bases similares a las que ocurren en la maduración de ARNt. En células animales las reacciones de co-

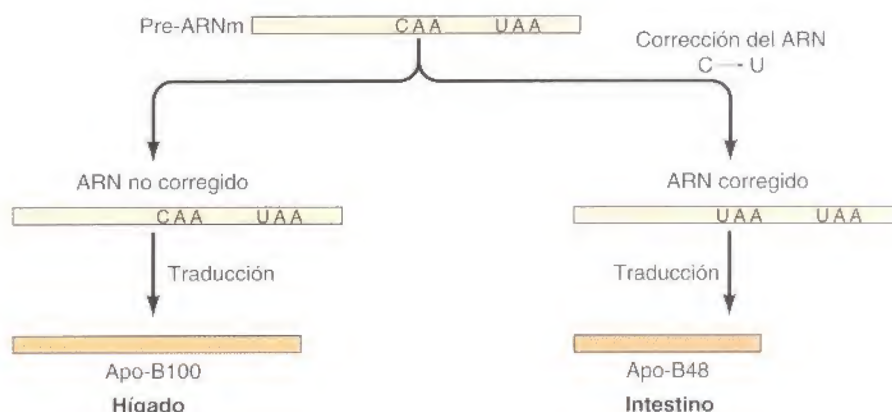



*Figura 6.50*
**Edición del mRNA de la apolipoproteína B.** En el hígado humano se traduce un ARNm no corregido, obteniéndose una proteína de 4.536 aminoácidos llamada Apo-B100. En el intestino humano, por el contrario, se corrige este ARNm mediante una modificación de bases que sustituye una C determinada por un U. Esta modificación transforma el codón de glutamina (CCA) en un codón de terminación (UAA), por lo que la síntesis proteínica se acorta dando lugar a la Apo-B48, con 2.152 aminoácidos.

rrección incluyen la desaminación de citosina a uridina y de adenosina a inosina. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la corrección del ARNm de la apolipoproteína B, que transporta lípidos en la sangre. En este caso, la corrección con especificidad tisular del ARN da lugar a la producción de dos formas distintas de apolipoproteína B (Fig. 6.47). La Apo-B100 humana (4.536 aminoácidos) se sintetiza en el hígado por medio de la traducción del ARNm sin editar. Sin embargo, tras la traducción a nivel intestinal de un ARNm corregido en el que una C es transformada en una U por desaminación se obtiene una proteína más corta (Apo-B48, 2.152 aminoácidos). Esta alteración cambia el codón para glutamina (CAA) por un codón de terminación de la traducción (UAA) en el ARNm corregido, llevando a la síntesis de una proteína Apo-B más corta. La corrección con especificidad tisular del ARNm de la Apo-B lleva a la expresión de proteínas distintas desde un punto de vista estructural y funcional en el hígado e intestino. La Apo-B100 producida por el hígado transporta lípidos en el torrente sanguíneo; la Apo-B48 interviene en la absorción de lípidos de origen dietético en el intestino.

La corrección del ARN por la deaminación de la adenosina en inopina es la forma más común de corrección nuclear del ARN en mamíferos. Este modo de corrección juega un papel importante en el sistema nervioso, donde la corrección de A-a-I resulta en cambios sencillos de aminoácido en los receptores para algunas moléculas señalizadoras en la superficie de las neuronas. La importancia de esta reacción de corrección ha sido claramente demostrada utilizando la recombinación homóloga para inactivar el gen que codifica la enzima responsable de la corrección de A-a-I en ratones (véase Capítulo 3). Los ratones que carecen de esta enzima mueren a temprana edad tras sufrir repetidos ataques epilépticos como resultado de la disfunción de receptores incorrectamente corregida.

## Degradación del ARN

Los pasos de maduración analizados en la sección previa resultan en la formación de ARNm maduros, que entonces son transportados al citoplasma, donde funcionan dirigiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo, la mayoría de las secuencias transcritas en pre-ARNm son degradadas en el interior del núcleo. Más del 90% de las secuencias de los pre-ARNm son intrones, que son degradados en el interior del núcleo después de su escisión por corte y empalme. Esto es llevado a cabo por una enzima que reconoce el enlace 2'-5' característico formado en el punto de ramificación, además de por enzimas que reconocen extremos 3' o 5' de las moléculas de ARN y catalizan la degradación de ARN en cualquier dirección. Los extremos 5' y 3' de los ARNm maduros están protegidos de esta maquinaria de degradación por la presencia de caperuzas y poliadenilación, respectivamente, mientras que los extremos no protegidos de los intrones son reconocidos y degradados.

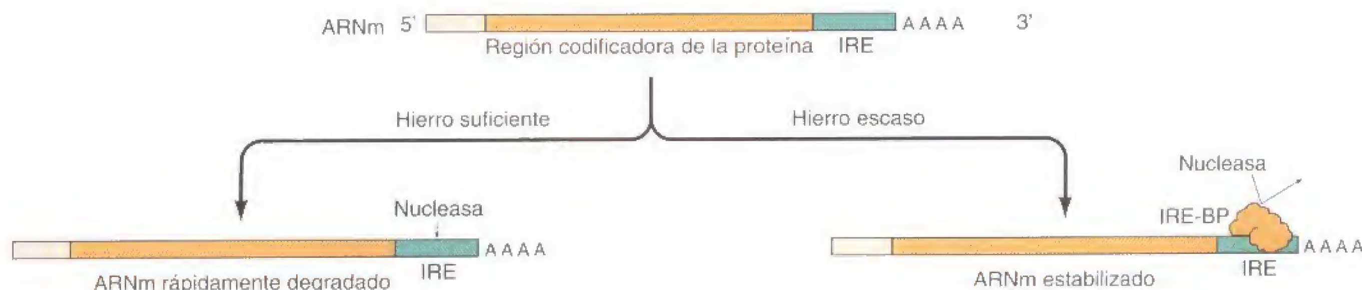
Además de degradar intrones, las células poseen un sistema de control de calidad (denominado **decaimiento de ARNm mediado sin sentido**) que dirige la degradación de ARNm que carecen de marcos de lectura abiertos completos. Esto elimina moléculas de ARNm defectuosas y previene la síntesis de proteínas anómalas truncadas. En levaduras, el decaimiento del ARNm mediado sin sentido tiene lugar en el citoplasma y se desencadena cuando un ribosoma se encuentra un codón de terminación prematura durante la síntesis proteica. En los mamíferos, sin embargo, al menos parte del decaimiento de ARNm mediado sin sentido tiene lugar en el interior del núcleo. El mecanismo por el que los codones de terminación son reconocidos en el interior del núcleo de las células de mamíferos no se conoce, aunque algunos estudios recientes sugieren que ribosomas en el interior del núcleo podrían estar implicados en el reconocimiento e incluso en la traducción nuclear de ARNm.

Lo que podría considerarse como el aspecto final de la maduración de una molécula de ARN es su eventual degradación en el citoplasma. Puesto que el nivel intracelular de ARN está determinado por un equilibrio entre la síntesis y la degradación, la tasa de degradación de ARNs individuales es otro nivel al que puede controlarse la expresión génica. Tanto los ARNs ribosómicos como los de transferencia son muy estables, y esta estabilidad es la principal responsable de los niveles elevados de estos ARNs (superior al 90% de todo el ARN) tanto en células procarióticas como eucarióticas. Por el contrario, los ARNm bacterianos se degradan rápidamente, poseyendo generalmente una vida media de tan sólo 2 a 3 minutos. Esta rápida renovación de ARNm bacterianos permite a la célula responder rápidamente a modificaciones en su entorno, como cambios en la disponibilidad de nutrientes requeridos para el crecimiento. En las células eucarióticas, sin embargo, los distintos ARNm son degradados a distintas velocidades, proporcionando un parámetro adicional para la regulación de la expresión génica eucariótica.

La degradación citoplásmica de la mayoría de los ARNm eucarióticos está iniciada por un acortamiento de las colas de poli-A. A continuación se produce la eliminación de la caperuza en 5′ y la degradación del ARN por parte de nucleasas que actúan sobre ambos extremos. La vida media de los ARNm en las células de mamífero varían desde 30 minutos hasta aproximadamente 20 horas. Los ARNm inestables frecuentemente codifican proteínas reguladoras, incluyendo ciertos factores de transcripción, cuyos niveles en el interior celular varían rápidamente en respuesta a estímulos del ambiente. Estos ARNm a menudo contienen secuencias específicas ricas en AU cerca de sus extremos 3′, que parecen señalizar una rápida degradación favoreciendo la deadenilación.

También puede ser regulada la estabilidad de algunos ARNms en respuesta a señales extracelulares. Un buen ejemplo es el del ARNm que codifica el receptor de la transferrina —una proteína de la superficie celular relacionada con la captación de hierro en células animales—. La cantidad de receptor de la transferrina en la célula se controla en función de la disponibilidad de hierro, en gran medida debido a la modulación de la estabilidad de su ARNm (Fig. 6.51). En presencia de una cantidad suficiente de hierro, el ARNm del receptor de la transferrina es rápidamente degradado como resultado del corte producido por

*Figura 6.51*
**Regulación de la estabilidad del ARNm del receptor de transferrina.** Los niveles del ARNm del receptor de la transferrina se regulan en función de la disponibilidad de hierro. Si el aporte de hierro es suficiente, el ARNm se degrada rápidamente mediante un corte cerca del extremo 3′ por una nucleasa. Si existe carencia de hierro, se une una proteína reguladora (llamada proteína de unión al elemento de respuesta al hierro, o IRE-BP) a una secuencia próxima al extremo 3′ del ARNm (el elemento de respuesta al hierro, o IRE), lo que protege al ARNm del corte de la nucleasa.



una nucleasa específica, en una secuencia cercana al extremo 3′. Si no existe un aporte adecuado de hierro, sin embargo, el ARNm es estabilizado, con lo que aumenta la síntesis de receptor de la transferrina y la célula capta una mayor cantidad de hierro. Esta regulación está mediada por una proteína que se une a secuencias específicas (denominadas elementos de respuesta al hierro, o IRE) cerca del extremo 3′ del ARNm del receptor de la transferrina y protege del corte al ARNm. La unión de la proteína reguladora al IRE está controlada por los niveles de hierro dentro de la célula: si escasea el hierro, la proteína se une al IRE y protege al ARNm de receptor de transferrina frente a la degradación. Cambios similares en la estabilidad de otros ARNm están relacionados con la regulación de la expresión génica por parte de ciertas hormonas. Por tanto, aunque la transcripción sigue siendo el nivel principal de control de la expresión génica, las variaciones en la velocidad de degradación del ARNm también desempeñan un papel importante en el control continuo de los niveles de los ARNm intracelulares.

## RESUMEN

PALABRAS CLAVE

### TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS

**ARN polimerasa, promotor, técnica del *footprinting***

***ARN polimerasa y transcripción:*** La ARN polimerasa de *E. coli* consta de subunidades $\alpha$, $\beta$, $\beta'$ y $\sigma$. La transcripción se inicia por la unión de $\sigma$ a las secuencias promotoras. Tras la síntesis de los primeros nucleótidos del ARN, el núcleo de la polimerasa se separa de $\sigma$ y viaja a lo largo del molde de ADN a medida que alarga la cadena de ARN. La transcripción continúa hasta que la polimerasa encuentra una señal de terminación.

**operón, operador, represor, elemento de control cis-actuante, factor transactuante**

***Represores y control negativo de la transcripción:*** El prototipo de regulación génica en bacterias es el operón *lac*, controlado por la unión de un represor a secuencias específicas del ADN cercanas al promotor.

***Control positivo de la transcripción:*** Algunos genes bacterianos son regulados mediante activadores transcripcionales en vez de represores.

### ARN POLIMERASAS EUCARIÓTICAS Y FACTORES DE TRASNCRIPCIÓN GENERALES

***ARN polimerasas eucarióticas:*** Las células eucarióticas contienen tres ARN polimerasas nucleares distintas, que transcriben genes que codifican mRNAs (polimerasa II), rRNAs (polimerasa I) y tRNAs (polimerasa III).

**factor de transcripción, factor de transcripción general, secuencia TATA, proteína de unión a TATA (TBP), factor asociado a TBP (TAF), Mediador**

***Factores de transcripción generales e iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II:*** Las ARN polimerasas eucarióticas no se unen directamente a las secuencias promotoras; necesitan proteínas adicionales (factores de transcripción generales) para iniciar la transcripción. Las secuencias promotoras de muchos genes para la polimerasa II son reconocidas por la proteína de unión a TATA, lo que atrae a la ARN polimerasa y a factores de transcripción adicionales hacia el promotor.

***Transcripción por las ARN polimerasas I y III:*** Las ARN polimerasas I y III también necesitan factores de transcripción adicionales para unirse a los promotores de los genes de ARNr y ARNt.

### REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

**estimuladores, aislador**

***Secuencias reguladoras de acción en* cis*: Promotores y estimuladores:*** La transcripción de genes eucarióticos está controlada por proteínas que se unen a secuencias reguladoras, las cuales pueden estar localizadas varias kilobases corriente arriba desde el punto de inicio de la transcripción.

Los estimuladores contienen de forma característica sitios de unión para múltiples proteínas que actúan conjuntamente en la regulación de la expresión génica.

***Proteínas reguladoras de la transcripción:*** Se han aislado muchos factores transcripcionales eucarióticos gracias a su unión a secuencias específicas de ADN.

**ensayo del cambio de movilidad electroforética, cromatografía de afinidad al ADN**

***Estructura y función de los activadores transcripcionales:*** Los activadores transcripcionales son proteínas modulares que contienen dominios diferentes de unión al ADN y de activación. Los dominios de unión al ADN median la asociación con secuencias reguladoras específicas; los dominios de activación estimulan la transcripción interaccionando con proteínas Mediadoras y con factores de transcripción generales, además de con coactivadores que modifican la estructura cromatínica.

**activador transcripcional, dominio en dedos de cinc, receptor de hormona esteroidea, hélice-giro-hélice, dominio homeo, secuencia homeo, cremallera de leucinas, hélice-bucle-hélice, coactivador**

***Represores eucarióticos:*** La expresión génica en células eucarióticas está regulada tanto por represores como por activadores. Algunos represores interfieren en la unión de activadores o factores de transcripción generales al ADN. Otros represores contienen dominios de represión que inhiben la transcripción interaccionando con factores de transcripción generales, activadores transcripcionales, o correpresores que afectan a la estructura cromatínica.

**correpresor**

***Relación de la estructura de la cromatina con la transcripción:*** El empaquetamiento del ADN en nucleosomas supone un impedimento para la transcripción en células eucarióticas. La modificación de las histonas por acetilación aumenta la accesibilidad del ADN nucleosómico por parte de los factores de transcripción, y esta modificación de la cromatina está íntimamente relacionada con la regulación transcripcional. Las enzimas que catalizan la acetilación de histonas están asociadas a los activadores transcripcionales, mientras que las desacetilasas de histonas se relacionan con los represores. Las histonas también son modificadas por fosforilación y metilación, y las modificaciones específicas de las histonas afectan a la expresión génica actuando como sitios de unión para otras proteínas reguladoras. Además, los factores remodeladores del nucleosoma facilitan la unión de factores de transcripción al ADN alterando la organización o estructuras de los nucleosomas. Así, la ARN polimerasa es capaz de transcribir a través de los nucleosomas rompiendo los contactos histona-ADN. La elongación transcripcional es facilitada por las proteínas cromosómicas no histónicas HMGN, y por los factores de elongación que reclutan histona acetiltransferasas además de actuar directamente rompiendo la estructura del nucleosoma.

**proteínas HMGN, acetilación de histonas, código de histonas, factor remodelador del nucleosoma, factor de elongación**

***Regulación de la transcripción por ARNs no codificantes:*** La transcripción puede ser regulada por ARNs no codificantes, además de por las proteínas reguladoras. La inactivación del cromosoma X proporciona un ejemplo de regulación génica por ARN no codificante en mamíferos.

**inactivación del cromosoma X**

***Metilación del ADN:*** La metilación de los residuos de citosina puede inhibir la transcripción de genes en vertebrados. La regulación de la expresión génica mediante metilación desempeña un importante papel en la impresión genómica, que controla la transcripción de algunos genes relacionados con el desarrollo de mamíferos.

**impresión genómica**

## MADURACIÓN Y RENOVACIÓN DEL ARN

***Maduración de los ARNs ribosómico y de transferencia:*** Los ARNs ribosómico y de transferencia proceden del corte de un largo transcrito primario, tanto en células procarióticas como eucarióticas. En los ARNr se añaden grupos metilo, y se modifican varias bases en los ARNt.

**pre-ARNr, pre-ARNt, ARNasa P, ribozima**

**pre-ARNm, casquete o cap de 7-metilguanosina, cola de poli-A, poliadenilación**

***Maduración del ARNm en eucariotas:*** Los pre-ARNm eucarióticos se modifican con la adición de casquetes o cap de 7-metilguanosina y colas de poli-A en 3′, además de la extracción de los intrones mediante corte y empalme.

**espliceosoma, pequeño ARN nuclear (ARNsn), RNPsn, autoempalme**

***Mecanismos de corte y empalme:*** El corte de los pre-ARNm nucleares se lleva a cabo en grandes complejos llamados espliceosomas, formados por proteínas y pequeños ARNs nucleares (ARNAsn). Los ARNsn reconocen secuencias en los puntos de corte de los pre-ARNm y catalizan la escisión. Algunos ARN mitocondriales, cloroplásticos y bacterianos tienen la habilidad de ser autoempalmantes, ya que el proceso está catalizado por secuencias de los intrones.

**corte y empalme alternativo**

***Corte y empalme alternativo:*** Pueden unirse los exones en diferentes combinaciones según sea el tipo de corte y empalmado, lo que supone un importante mecanismo en eucariotas complejos para el control de la expresión génica específica de tejido.

**corrección de ARN**

***Corrección del ARN:*** Algunos ARNm son modificados mediante procesos que alteran sus secuencias de codificación de proteínas. La corrección de ARNm mitocondriales en algunos protozoos incluye la adición y delección de residuos de U en múltiples puntos de la molécula. Otras formas de edición del ARN en células de plantas y mamíferos consisten en la modificación de bases específicas.

**decaimiento de ARNm mediado sin sentido.**

***Degradación del ARN:*** Los intrones son degradados en el interior del núcleo y los ARNm anómalos que carecen de marcos de lectura abiertos completos son eliminados por decaimiento del ARNm mediado sin sentido. Los ARNm funcionales en las células eucarióticas son degradados a diferentes velocidades, proporcionando un mecanismo adicional de control de la expresión génica. En algunos casos, las tasas de degradación del ARNm están reguladas por señales extracelulares.

## Preguntas

**1.** ¿Cómo induce la lactosa la expresión de proteínas necesarias para que *E. coli* pueda internalizar y metabolizar la lactosa?

**2.** La secuencia consenso del elemento promotor −10 de *E. coli* es TATAAT. Está comparando dos promotores −10 que tienen secuencias TATGAT y CATGAT respectivamente: ¿Cuál de ellos esperaría usted que se transcribiera con mayor eficacia?

**3.** Está trabajando con dos cepas de *E. coli*. Una de ellas contiene un gen de $\beta$-galactosidasa salvaje y una mutación $i^-$; la otra contiene un gen de $\beta$-galactosidasa sensible a la temperatura y una mutación $o^c$. Después del cruzamiento de ambas cepas, intenta conseguir la producción de $\beta$-galactosidasa a temperaturas permisivas y no permisivas en ausencia de lactosa. ¿Qué esperaría encontrar?

**4.** ¿Cómo muestra el *footprinting* del ADN dónde se une una proteína a una secuencia específica de ADN?

**5.** ¿Qué papel juegan los factores sigma ($\sigma$) en la síntesis de ARN bacteriano?

**6.** ¿Cómo termina un ARNm de *E. coli*?

**7.** Las células eucarióticas poseen tres ARN polimerasas distintas. ¿Qué ARNs transcribe cada una de ellas?

**8.** Está comparando, para la transcripción basal *in vitro*, las necesidades de dos genes de polimerasa II, uno que contiene la secuencia TATA y el otro que tan sólo contiene una secuencia Inr. La transcripción con estos promotores, ¿requiere la presencia de TBP o de TFIID?

**9.** ¿Cómo difieren los estimuladores o *enhancers* de los promotores como las secuencias de regulación en cis en eucariotas?

**10.** Está estudiando el estimulador de un gen que normalmente sólo se expresa en neuronas. En los modelos en los que este estimulador está ligado a un gen reportero existe expresión en células neuronales pero no en fibroblastos. Si embargo, si muta un elemento secuencial específico dentro del estimulador, aparece la expresión tanto en células neuronales como en fibroblastos. ¿Qué tipo de proteína reguladora esperaría que se uniera a ese elemento estimulador?

**11.** Se encuentra un factor de transcripción que activa la transcripción mediante su unión con diferentes secuencias del ADN en células musculares y hepáticas. ¿Cómo puede influir el mecanismo de corte y empalme alternativo en la determinación de esta especificidad tisular o en la acción activadora?

**12.** ¿Cuál es la función de los aisladores?

**13.** Explica el mecanismo de la inactivación del cromosoma X en las mujeres.

## Bibliografía

### *Transcripción en procariotas*


Busby, S. and R. H. Ebright. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79: 743-746. [R]

Darst, S. A. 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11: 155-162. [R]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 56: 1891-1899. [P]

Hochschild, A. and S. L. Dove. 1998. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell* 92: 597-600. [R]

Jacob, R and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. *Mol. Biol.* 3: 318-356. [P]

Lewis, M., G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kirchner, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan and P. Lu. 1996. Crystal structure of the lactost operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271:1247-1254. [P]

Murakami, K. S., S. Masuda and S. A. Darst. 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296: 1280-1284. [P]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Uptain, S. M., C. M. Kane and M. J. Chamberlin. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 117-172. [R]

Vassylyev, D.G., S. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassylyeva, S. Borukhov and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerse holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417: 712-719. [P]

Zhang, G., E. A. Campbell, E. A., L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerasa at 3.3 Å resolution. *Cell* 98: 811-824. [P]


### *ARN polimerasas eucarióticas y factores de transcripción generales*


Butler, J. E. F. and J. T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16: 2583-2592. [R]

Conaway, J. W., A. Shilatifard, A. Dvir and R. C. Conaway. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25: 375-380. [R]

Cramer, P., D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David and R. D. Kornberg. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implicartins for the transcription mechanism. *Science* 288: 640-649. [P]

Cramer, P., D. A. Bushnell and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science* 292: 1863-1876. [P]

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and euykaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304: 687-698. [R]

Lee, T. I. and R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 34: 77-137. [R]

Matsui, T., J. Segall, P. A. Weil and R. G. Roeder. 1980. Múltiple factors are required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992-11996. [P]

Myers, L. C. and R. D. Kornberg. 2000. Mediator of transcritional regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 729-749. [R]

Naar, A. M., B. D. Lemon andR. Tijan. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 475-501. [R]

Nikolov, D. B., H. Chen, E. D. Halay A. A. üsheva, K. Hisatake, D. K. Lee, R. G. Roeder and S. K. Burley 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377: 119-128. [P]

Orphanides, G. and D. Reinberg. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439-451. [R]

Schramm, L. and N. Hernández. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16: 2593-2620. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469-484. [P]

Woychik, N. A. and M. Hampsey. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108: 469-463. [R]


### *Regulación de la transcripción en eucariotas*


Atchison, M. L. 1988. Enhancers: Mechanisms of action and cell specificity. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4: 127-153. [R]

Banerji, J., S. Rusconi and W. Schaffner. 1981. Expression of a $\beta$-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299-308. [P]

Berger, S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 142-148. [R]

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21. [R]

Brent, R. and M. Ptashne. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repres-sor. *Cell* 43: 729-736. [P]

Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis. 1996. *Tetrahymena* histone acetyitransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851. [P]

Bustin, M. 2001. Chromatin unfolding and activation by HMGN chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26: 431-437. [R]

Cohen, D. E. and J. T. Lee. 2002. X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 219–224. [R]

Conaway, J. W., A. Shilatifard, A. Dvir and R. C. Conaway. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25: 375-380. [R]

Courey, A. J. and S. Jia. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* 15: 2786-2796. [R]

Dynan, W. S. and R. Tjian. 1983. The promoter-specific transcription factor Spi binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87. [P]

Ferguson-Smith, A. C. and M. A. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293: 1086-1089. [R]

Hanna-Rose, W. and U. Hansen. 1996. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* 12: 229-234. [R]

Horn, P. J. and C. L. Peterson. 2002. Chromatin higher order folding: wrapping up transcription. *Science* 297: 1824-1827. [R]

Jenuwein, T. and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080. [R]

Kadonaga, J. T. 1998. Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92: 307-313. [R]

Kadonaga, J. T. and R. Tjian. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 83:5889-5893. [P]

Kornberg, R. D. and Y. Lorch. 1992. Chromatin structure and transcription. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 563-587. [R]

Lee, T. I. and R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 34: 77-137. [R]

Licht, J. D., M. J. Grossel, J. Figge and U. M. Hansen. 1990. *Drosophila Krüppel* protein is a transcriptional repressor. *Nature* 346: 76-79. [P]

Matzke, M., A. J. M. Matzke and J. M. Kooter. 2001. RNA: guiding gene silencing. *Science* 293: 1080-1083. [R]

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474. [R]

McKnight, S. L. and R. Kingsbury 1982. Transcriptional control signáis of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217: 316-324. [P]

Naar, A. M., B. D. Lemon and R. Tjian. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 475-501. [R]

Narlikar, G. J., H.-Y. Fan and R. E. Kingston. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487. [R]

Orphanides, G. and D. Reinberg. 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407: 471-475. [R]

Pabo, C. O. and R. T. Sauer. 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095. [R]

Panning, B. and R. Jaenisch. 1998. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93: 305-308. [R]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Richards, E. J. and S. C. R. Elgin. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108: 489-500. [R]

Schreiber, S. L. and B. E. Bernstein. 2002. Signaling network model of chromatin. *Cell* 111: 771-778. [R]

Staudt, L. M. and M. J. Lenardo. 1991. Immunoglobulin gene transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 373-398. [R]

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408-411. [P]

Tilghman, S. M. 1999. The sins of the fathers and mothers: Genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96: 185-193. [R]

Turner, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291. [R]

Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. S. Grewal and R. A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837. [P]

West, A. G., M. Gaszner and G. Felsenfeld. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16: 271-288. [R]

Wolffe, A. 1998. *Chromatin: Structure and Function*. 3rd. ed. New York: Academic Press.

### *Maduración y recambio del ARN*

Abelson, J., C. R. Trotta and H. Li. 1998. tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 273: 12685-12688. [R]

Baker, B. S. 1989. Sex in flies: the splice of life. *Nature* 340: 521-524. [R]

Blanc, V. and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. J. Biol. Chem. 278: 1395-1398. [R]

Cech, T. R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 543-568. [R]

Dodson, R. E. and D. J. Shapiro. 2002. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucl. Acid Res.* 72: 129-164. [R]

Frank, D. N. and N. R. Pace. 1998. Ribonuclease P: Unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 153-180. [R]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857. [P]

Hirose, Y. and J. L. Manley. 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14: 1415-1429. [R]

Hopper, A. K. and E. M. Phizicky. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 17: 162-180. [R]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28. [R]

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157. [P]

Maas, S., A. Rich and K. Nishikura. 2003. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J. Biol. Chem.* 278: 1391-1394. [R]

Madison-Antenucci, S., J. Grams and S. L. Hajduk. 2002. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell* 108: 435-438. [R]

Maniatis, T. and R. Reed. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 499-506. [R]

Maniatis, T. and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236-243. [R]

Moore, M. J. 2002. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431-434. [R]

Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy and P. A. Sharp. 1984. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225: 898-903. [P]

Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35: 101-107. [P]

Proudfoot, N. J., A Furger and M. J. Dye. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108: 501-512. [R]

Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis and M. R. Green. 1984. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38: 317-331. [P]

Smith, C. W. J. and J. Valcarcel. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25: 381-388. [R]

Valadkhan, S. and J. L. Manley. 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* 413: 701-7078. [P]

Van Hoof, A. and R. Parker. 2002. Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr. Biol.* 12: R285-R287. [R]

Villa, T., J. A. Pleiss and C. Guthrie. 2002. Spliceosomal snRNAs: $Mg^{2+}$-dependent chemistry at the catalytic core? *Cell* 109: 149-152. [R]

# 7

# Síntesis de proteínas, procesamiento y regulación



A LA TRANSCRIPCIÓN Y AL PROCESAMIENTO DEL ARN LES SIGUE LA TRADUCCIÓN, es decir, la síntesis de proteínas guiada por un molde de ARNm. Las proteínas son los mediadores activos en la mayoría de los procesos celulares, llevando a cabo las funciones determinadas por la información codificada en el ADN genómico. La síntesis de proteínas es la etapa final de la expresión génica. Sin embargo, la traducción del ARNm es sólo el primer paso en la constitución de una proteína funcional. La cadena polipeptídica se debe plegar en una conformación tridimensional adecuada y, con frecuencia, ésta es procesada antes de dar lugar a la forma activa. El procesamiento, especialmente en eucariotas, está muy relacionado con el transporte de las distintas proteínas a su destino final dentro de la célula.

Aunque la expresión de la mayoría de los genes se regula principalmente a nivel de la transcripción (véase Cap. 6), la expresión génica también se regula a nivel de la traducción, y este control es un elemento importante de la regulación génica tanto en células procariotas como eucariotas. Sin embargo, un mayor significado tienen los mecanismos que controlan la actividad de las proteínas en la célula. Una vez sintetizadas, la mayoría de las proteínas pueden ser reguladas, en respuesta a señales extracelulares, ya sea por modificaciones covalentes o mediante asociación con otras moléculas en el interior de la célula. Además, el nivel de las proteínas en la célula se regula a través de una degradación de proteínas diferencial. En definitiva, estos sistemas de control de la cantidad y actividad de las proteínas intracelulares regulan todos los aspectos del comportamiento celular.

## Traducción del ARNm

Las proteínas se sintetizan a partir de un molde de ARNm mediante un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución (tratado en el Cap. 3). Todos los ARNm se leen en dirección 5'-3', y las cadenas polipeptídicas se sintetizan desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal. Cada aminoácido viene codificado por tres bases (un codón) en el ARNm, de acuerdo con el carácter casi universal del código genético. El mecanismo fundamental de la síntesis de proteínas es básicamente el mismo en todas las células: la traducción tiene lugar en los ribosomas, siendo los ARNs de transferencia los adaptadores entre el molde de ARNm y los aminoácidos incorporados a la proteína. La síntesis de proteínas, por tanto, implica la interacción entre tres tipos de moléculas de ARN (el molde de ARN mensajero, ARNt y ARNr) además de varias proteínas necesarias para la traducción.

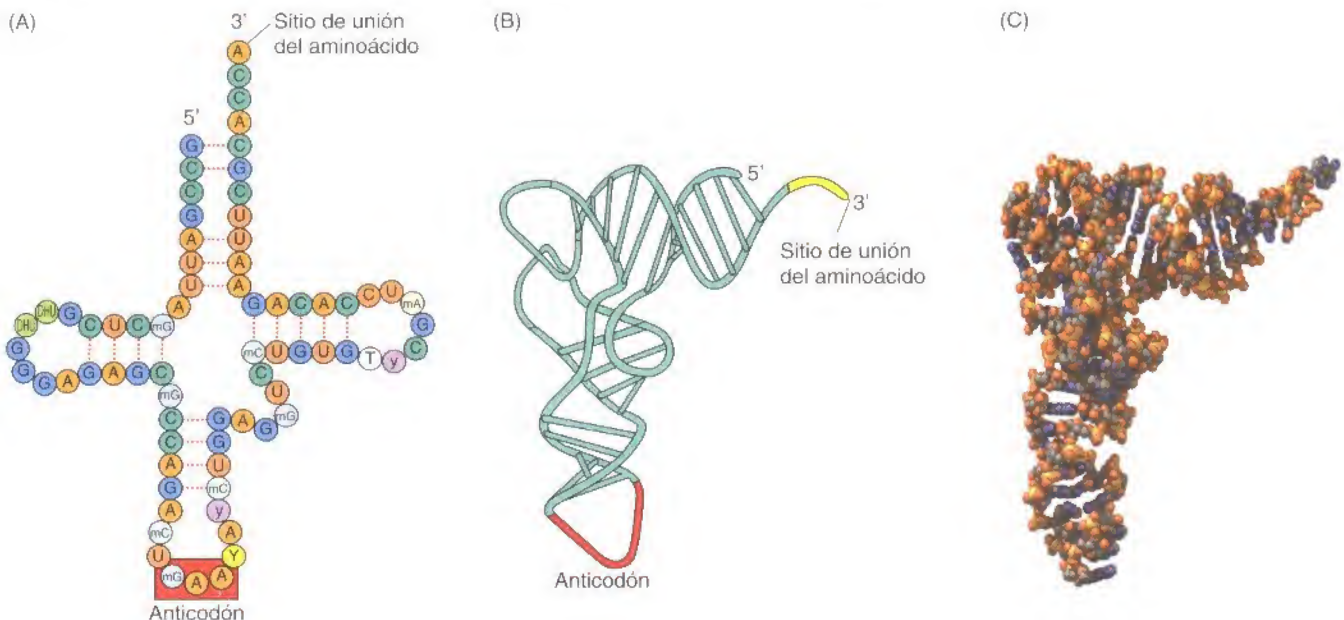
## *ARN de transferencia*

Durante la traducción, cada uno de los 20 aminoácidos debe ser alineado con su correspondiente codón del ARNm molde. Todas las células contienen distintas moléculas de **ARN de transferencia** que sirven como adaptadores en este proceso. Como es de esperar, dada su función en la síntesis de proteínas, los distintos ARNt presentan una estructura similar. Sin embargo también poseen secuencias únicas que permiten la unión de un aminoácido concreto con su codón en el ARNm.

Los ARN de transferencia tienen una longitud de aproximadamente 70-80 nucleótidos, con una estructura en forma de hoja de trébol que es debida a la complementariedad de bases entre distintas regiones de la molécula (Fig. 7.1). Mediante técnicas de cristalografía de rayos X se ha visto que los distintos ARNt poseen un plegamiento similar, en forma de L, que es necesario para el correcto anclaje a los ribosomas durante la traducción. Los ARNt para actuar como adaptadores necesitan dos regiones distintas y separadas en la molécula. Todos los ARNt poseen una secuencia CCA en su extremo 3' al cual los aminoácidos se unen covalentemente, en concreto a la ribosa de la adenosina terminal. La secuencia del ARNm es reconocida por el lazo **anticodón**, localizado en el otro extremo de la molécula de ARNt plegada, el cual se une al codón adecuado mediante complementariedad de bases.

La incorporación de los aminoácidos correctos en la proteína depende de la unión de cada uno de ellos a su ARNt, así como de la especificidad del apareamiento de bases entre codón y anticodón. La unión del aminoácido a su ARNt específico es mediado por un grupo de enzimas llamadas **aminoacil ARNt sintetasas**, descubiertas por Paul Zamecnik y Mahlon Hoagland en 1957. Cada una de estas enzimas reconoce un único aminoácido, y también al ARN (o ARNs) de transferencia al cual se debe unir ese aminoácido. La reacción ocurre en dos etapas (Fig. 7.2). Primero el aminoácido es activado mediante una reacción con ATP formándose un intermediario aminoacil AMP. Este aminoácido activado se une posteriormente al extremo 3' del ARNt. Las aminoacil ARNt sintetasas deben ser enzimas muy selectivas que reconozcan específicamente tanto los aminoácidos individuales como la secuencia de bases específica en los ARNt aceptores. En algunos casos la alta fidelidad del reconocimiento del aminoácido es debido en parte a una actividad correctora o «lectora de pruebas», por la cual el aminoacil AMP incorrecto es hidrolizado antes de unir-

*Figura 7.1*
**Estructura de los ARNt.** Se ilustra en un modelo abierto en forma de «hoja de trébol» (A) la estructura del ARNt de la fenilalanina de levadura, mostrando la complementariedad de pares de bases. Las bases nitrogenadas modificadas se indican como mG, metilguanosina; mC, metilcitosina; DHU, dihidrouridina; T, ribotimidina; Y, una purina modificada (normalmente adenosina); y ψ, seudouridina. La forma plegada de la molécula se representa en (B) y el modelo tridimensional en (C). (C, cortesía de Dan Richardson.)



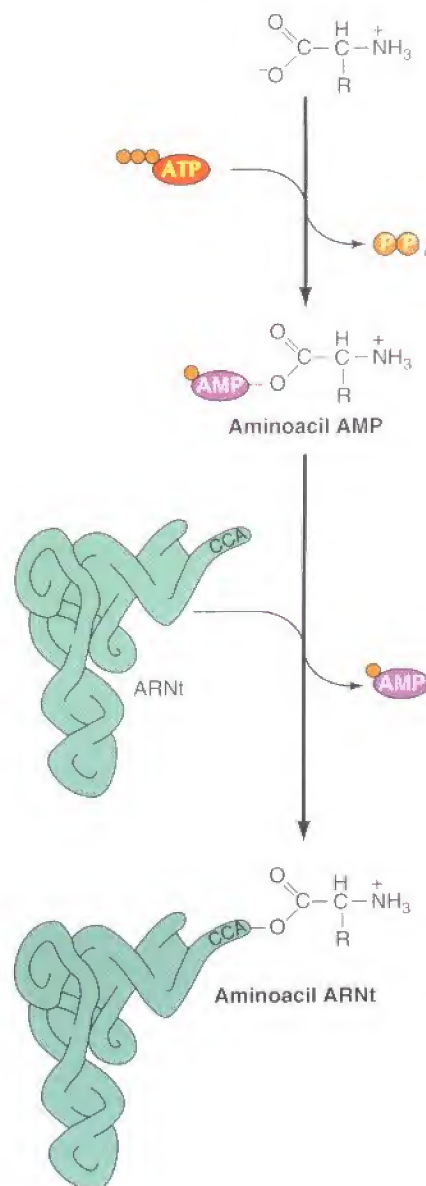



*Figura 7.2*
**Unión del aminoácido al ARNt.** En la primera reacción, el aminoácido se une al AMP y se forma un intermediario aminoacil AMP. En la segunda reacción, se produce la transferencia del aminoácido al extremo CCA 3' del ARNt aceptor, liberándose el AMP. Las dos reacciones son catalizadas por la aminoacil ARNt sintetasa.

se al ARNt en la segunda etapa de la reacción. El reconocimiento del ARNt correcto por la aminoacil ARNt sintetasa también es un proceso muy selectivo: la sintetasa reconoce secuencias de nucleótidos específicas (en la mayor parte de los casos incluye el anticodón) que identifican como única a cada especie de ARNt.

Tras la unión al ARNt, el aminoácido se alinea en el ARNm molde por la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt. Este reconocimiento codón-anticodón es mucho menos estricto que la complementariedad A-U y G-C explicada en capítulos anteriores. El significado de este apareamiento de bases atípico entre el codón y el anticodón está relacionado con la redundancia del código genético. De los 64 codones posibles, 3 son codones de terminación de la traducción y los otros 61 codifican para los aminoácidos (véase Tabla 3.1). Esto significa que la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón. Esta redundancia se puede explicar, en parte, por la unión de varios aminoácidos a más de una especie de ARNt. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 40 ARNt diferentes que sirven como aceptores de los 20 aminoácidos distintos. Además, algunos ARNt son capaces de reconocer más de un codón en el ARNm, como resultado de un reconocimiento no estándar (denominado «balanceo») entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de algunos codones complementarios (Fig. 7.3). En esta posición hay un apareamiento de bases débil debido a la formación de pares de bases G-U y a la sustitución de la guanosina por inosina en los anticodones de muchos ARNt (véase Fig. 6.40). La inosina es una base nitrogenada que puede formar pareja con C, U o A en la tercera posición del codón, por lo cual si la inosina aparece en el anticodón permite que un único ARNt reconozca 3 codones diferentes en la secuencia del mensajero.

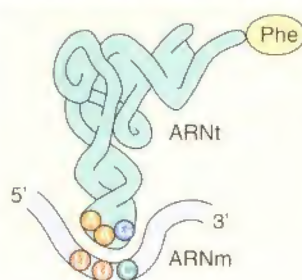
## *Ribosoma*

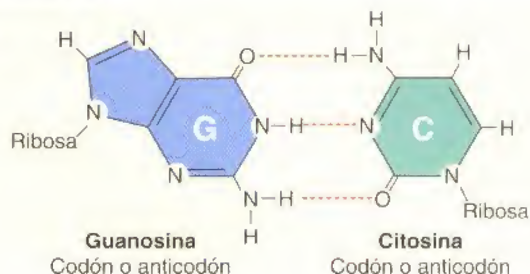
Los **ribosomas** son el lugar donde se sintetizan las proteínas tanto en células procariotas como eucariotas. Se caracterizaron como partículas subcelulares mediante ultracentrifugación de células lisadas y normalmente se designan de acuerdo con su coeficiente de sedimentación: 70S para los ribosomas procariotas y 80S para los ribosomas de células eucariotas, los cuales son de mayor tamaño. Tanto los ribosomas procariotas como eucariotas están formados por 2 subunidades distintas, compuestas por proteínas y por **ARNs ribosómicos**. El hecho de que una célula contenga muchos ribosomas refleja la importancia de la síntesis de proteínas en el metabolismo celular. *E. coli*, por ejemplo, contiene aproximadamente 20.000 ribosomas, ocupando cerca del 25 % del peso seco de la célula, y las células de mamíferos en continua división contienen aproximadamente 10 millones de ribosomas.

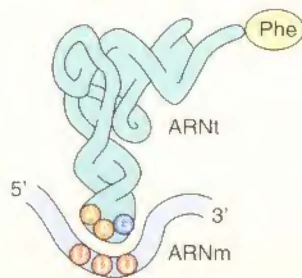
La estructura general de los ribosomas procariotas y eucariotas es similar, aunque difieren en algunos detalles (Fig. 7.4). La subunidad pequeña del ribosoma de *E. coli* (llamada 30S) está formada por un ARNr 16S y 21 proteínas distintas; la subunidad grande (50S) está compuesta por dos ARNr, 23S y 5S, y 34 proteínas. Cada ribosómica contiene una única copia de los ARNr y una única copia de cada proteína ribosómica, con una excepción: una proteína de la subunidad 50S está presente en cuatro copias. Las subunidades de los ribosomas eucariotas son de mayor tamaño y contienen más proteínas que sus análogos procariotas. La subunidad pequeña (40S) del ribosoma eucariota está com-

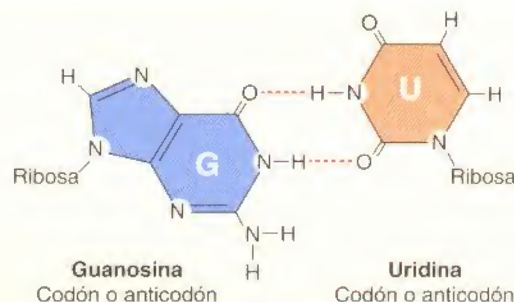
*Figura 7.3*
**Apareamiento no estándar entre el codón y el anticodón.** El apareamiento de bases en la tercera posición del codón es muy débil; se permite que G se una a U, y que inosina (I) en el anticodón se una a U, C o A. Se muestran dos ejemplos de apareamiento anormal de bases, donde el fenilalanil (Phe) ARNt reconoce los codones UUC o UUU y el alanil (Ala) ARNt reconoce los codones GCU, GCC o GCA.

**Apareamiento del ARNt de la fenilalanina**

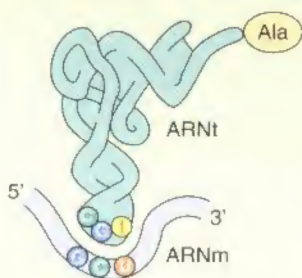


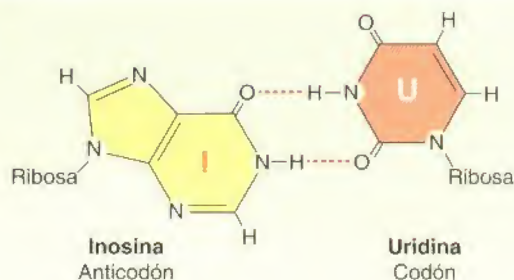



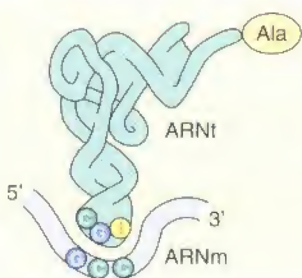



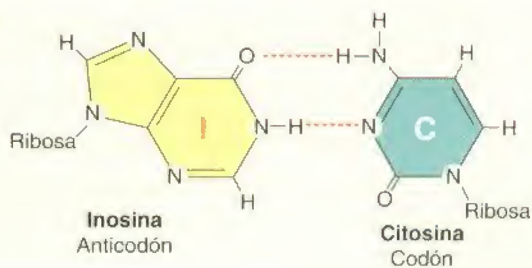



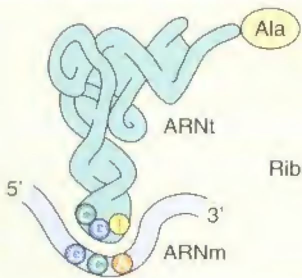

**Apareamiento del ARNt de la alanina**

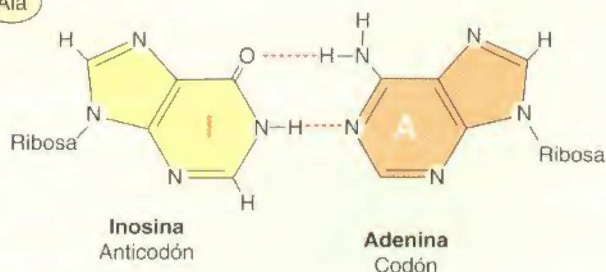


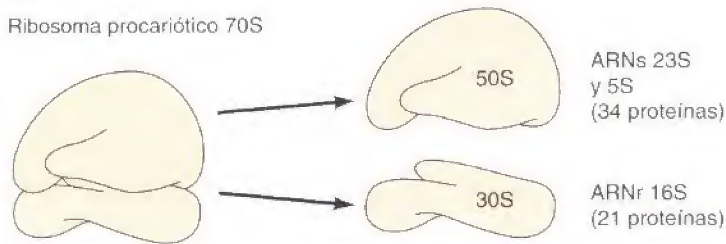



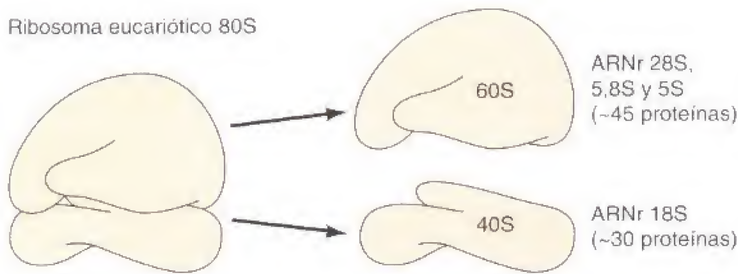



(A)




(B)



(C)

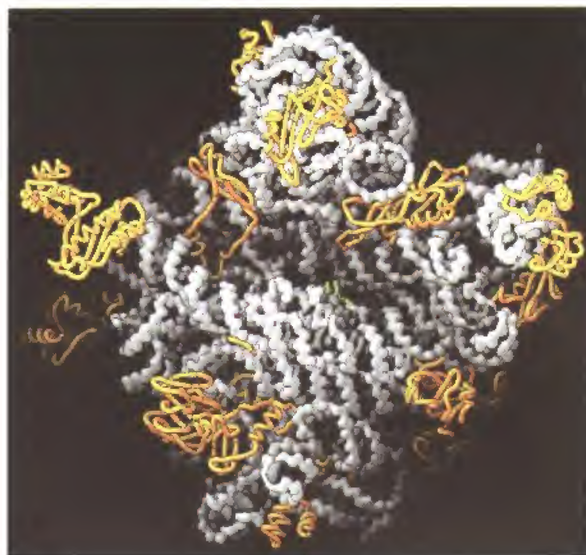


*Figura 7.4*
**Estructura ribosómica.** (A) Los componentes de los ribosomas procarióticos y eucarióticos. Los ribosomas intactos procarióticos y eucarióticos se denominan 70S y 80S, respectivamente, en base a su velocidad de sedimentación durante la ultracentrifugación. Consisten en subunidades mayores y menores, las cuales contienen proteínas ribosómicas y ARNr. (B-C) Estructuras cristalinas de rayos X de alta resolución de las subunidades ribosómicas 30S (B) y 50S (C). (B, de B.T. Wimberly, D. E. Brodersen, W.M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrrhein, T. Hartrsch y V. Ramakrishnan, 2000 *Nature* 407: 327. C, de N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore y T. A. Steitz, 2000. *Science* 289: 905.)

puesta por ARNr 18S y unas 30 proteínas, la subunidad grande (60S) contiene los ARNr 28S, 5,8S y 5S además de 45 proteínas. Debido a su gran tamaño y complejidad, el análisis estructural de alta resolución de los ribosomas mediante cristalografía de rayos X no se consiguió hasta el año 2000, cuando se describieron por primera vez la estructura de las subunidades 50S y 30S. Como se describe más adelante, comprender la estructura de los ribosomas a nivel atómico ha tenido un gran impacto sobre nuestra comprensión de la función ribosómica.

Una característica importante de los ribosomas es que se pueden crear *in vitro* por autoensamblaje de sus ARNr y proteínas. Como describió Masayasu Nomura en 1968 por primera vez, las proteínas ribosómicas purificadas y los ARNr pueden mezclarse y, en condiciones adecuadas, formar un ribosoma funcional. Aunque el ensamblaje de los ribosomas *in vivo* (particularmente en las células eucariotas) es considerablemente más complejo, la capacidad de los ribosomas de auto-ensam-

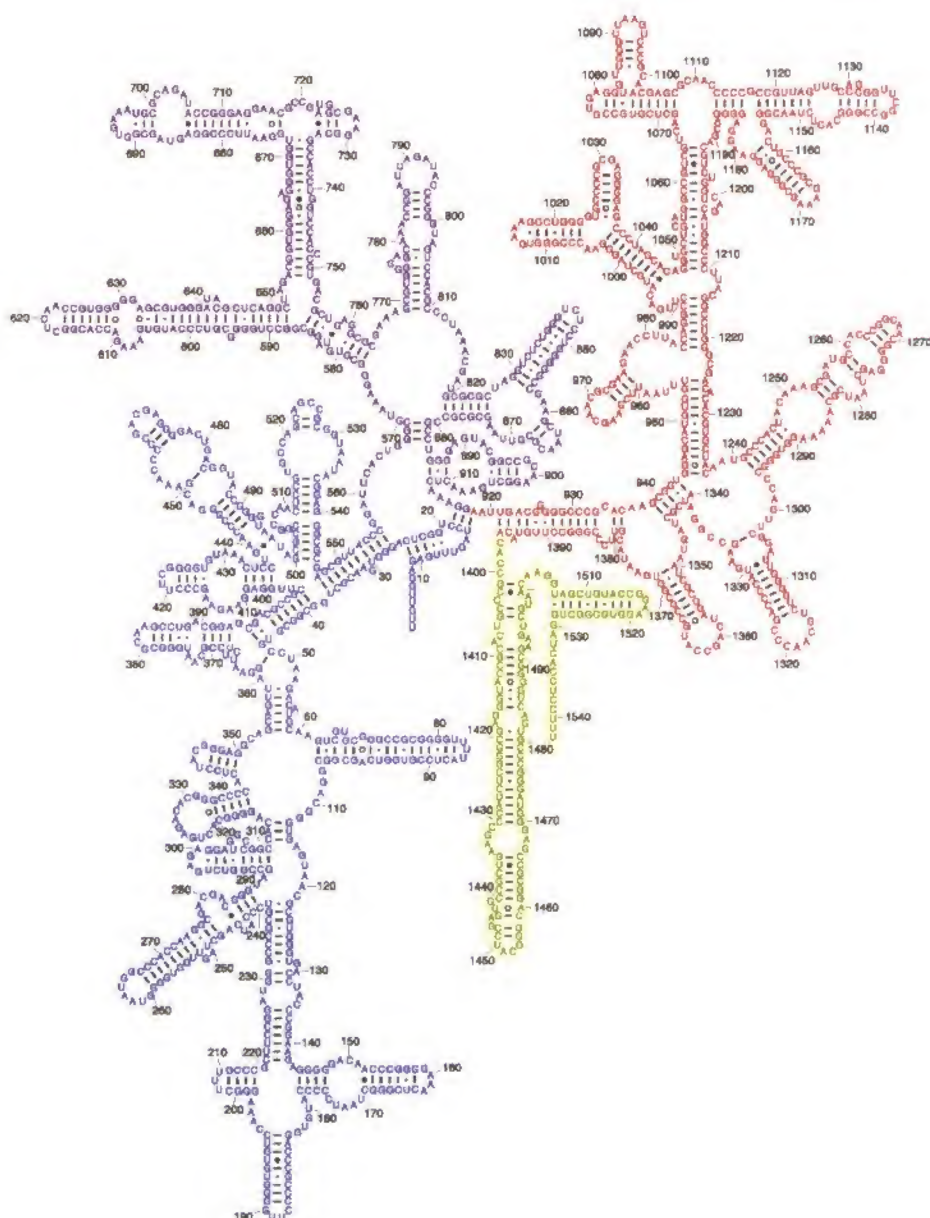


*Figura 7.5*
**Estructura del ARNr 16S.** El apareamiento de los pares de bases complementarios da lugar a una estructura secundaria característica. (De M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. H. Earnest, J. H. D. Cate and H. F. Noller. 2001. *Science* 292: 883.)

blarse *in vitro* proporciona una valiosa herramienta experimental, permitiendo el análisis de las funciones de las proteínas y de los ARN ribosómicos.

Al igual que los ARNt, los ARNr forman estructuras secundarias características debido a la complementariedad de bases (Fig. 7.5). Los ARNr asociados a las proteínas ribosómicas se pliegan en un nivel conformacional superior formando estructuras tridimensionales. Inicialmente se pensaba que los ARNr tenían un papel exclusivamente estructural, siendo un andamio sobre el que se ensamblaban las proteínas ribosómicas. Sin embargo, con el descubrimiento de la actividad catalítica de otras moléculas de ARN (p. ej., ARNasa P y el corte y empalme de los intrones, explicado en el Cap. 6), la posible actividad catalítica del ARNr está mucho más aceptada. De acuerdo con esta hipótesis se ha visto que los ARNr son absolutamente necesarios para el ensamblaje *in vitro* de los ribosomas funcionales. Por otro lado, la falta de proteínas ribosómicas provoca un descenso, pero no una pérdida completa, de actividad ribosómica.

La evidencia de la actividad catalítica del ARNr se obtuvo con los experimentos de Harry Noller y sus colaboradores en 1992. Estos investigadores de-

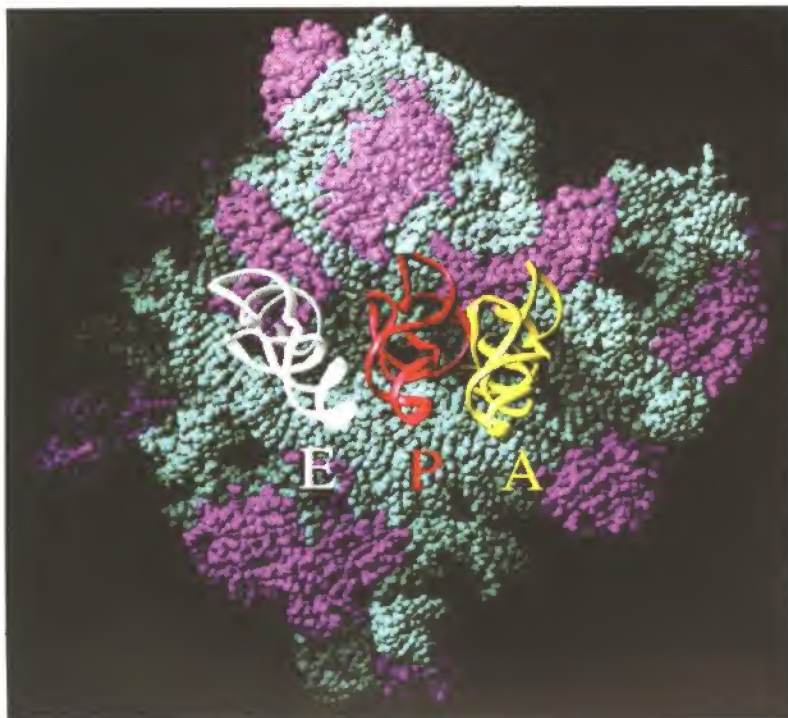



*Figura 7.6*
**Estructura de la subunidad ribosómica 50S.** Un modelo de alta resolución de la subunidad ribosómica 50S con tres moléculas de ARNt adheridas a los dominios A, P, y E del ribosoma (véase Fig. 7.12). Las proteínas ribosómicas se muestran en rosa y el ARNr en azul. (De P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore y T. A. Steitz. 2000. *Science* 289: 920.)

mostraron que la subunidad grande del ribosoma es capaz de catalizar la formación de enlaces peptídicos (la reacción de la peptidil transferasa) incluso tras la extracción de, aproximadamente, el 95 % de las proteínas del ribosoma mediante técnicas estandarizadas de extracción de proteínas. Por otro lado, vieron que tratando el ribosoma con ARNasa no se formaba el enlace peptídico, lo que reforzaba la hipótesis de que la formación del enlace peptídico es una reacción catalizada por el ARN. Sin embargo, algunas proteínas ribosómicas no podían eliminarse bajo condiciones que dejasen al ARN ribosómico intacto, de modo que el papel de las proteínas ribosómicas como catalizadores de la formación del enlace peptídico no podía descartarse por completo.

Evidencia de que la síntesis proteica está catalizada por el ARNr se obtuvo con el primer análisis estructural de alta resolución de la subunidad 50S, que fue descrito por Peter Moore, Thomas Seitz y sus colaboradores en el año 2000 (Fig. 7.6). Esta visión a nivel atómico de la estructura del ribosoma reveló que las proteínas ribosómicas estaban notablemente ausentes del sitio en el que se producía la reacción peptidil transferasa, poniendo de manifiesto que el ARNr era el responsable de catalizar la formación del enlace peptídico. El análisis estructural también sugería que los residuos de ARNr en su centro activo podían catalizar la formación del enlace peptídico mediante reacciones de transferencia de protones, lo que resulta semejante a la reversión de la hidrólisis de enlaces peptídicos por parte de serín proteasas (véase Fig. 2.26). Aunque se necesitan más estudios para determinar si el mecanismo propuesto es correcto, se ha establecido firmemente que la reacción fundamental de la síntesis proteica es catalizada por el ARN ribosómico. En lugar de ser los principales constituyentes catalíticos de los ribosomas, actualmente se cree que las proteínas ribosómicas juegan un papel principalmente estructural.

El papel catalítico del ARNr en la formación del enlace peptídico tiene importantes implicaciones en la evolución. Se cree que los ARNs fueron las primeras macromoléculas con capacidad de autorreplicación (véase Cap. 1); ésto se fundamenta en el hecho de que las ribozimas, como la ARNasa P y los intrones que participan en su propio proceso de corte y empalme, catalizan reacciones en las que participan sustratos tipo ARN. El papel del ARNr en la formación del



## Experimento clave

# *Papel catalítico del ARN ribosómico*

**Resistencia anormal de la peptidil transferasa a los procedimientos de extracción de proteínas**
Harre F. Noller, Vernita Hoffarth y Ludwika Zimniak
Universidad de California, Santa Cruz
*Science, Volumen 256, 1992, págs. 1416-1419*

### Contexto

El papel de los ribosomas en la síntesis de proteínas se descubrió en la década de los 60. Durante este período, los ribosomas se caracterizaron como partículas formadas por proteínas y ARNs y también se consiguió ensamblar ribosomas funcionales a partir de sus componentes purificados. En estos años también se consideraba que la formación del enlace peptídico (reacción peptidil transferasa) era llevada a cabo por las proteínas ribosómicas mientras que los ARNr tenían una función secundaria, participando en la estructura del ribosoma. Al principio de la década de los 70, sin embargo, la evidencia empezó a sugerir que los ARNr podrían tener un papel mucho más activo en la síntesis de proteínas. Por ejemplo, se descubrió que muchas proteínas ribosómicas no tenían un papel esencial en la función del ribosoma. Por otro lado, la demostración de la existencia de algunas secuencias en el ARNr altamente conservadas en la evolución sugirió que estas moléculas de ARNr podrían tener un papel crítico.

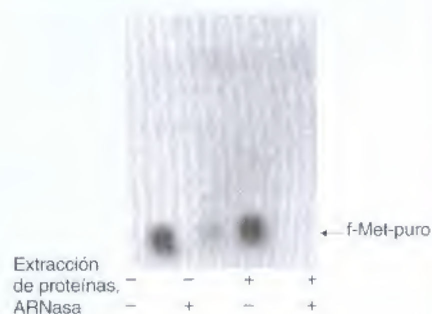
Fue al principio de los 80, con los experimentos de Tom Cech realizados en ribozimas de *Tetrahymena* y los de Sidney Altman utilizando la ARNasa P, cuando se confirmó la actividad catalítica de las moléculas de ARN. Estos descubrimientos fueron el precedente para la hipótesis de que el ARNr está directamente implicado en la formación del enlace peptídico.

Las conclusiones a las que llegaron Harry Noller y sus colaboradores, en 1992, en favor de este papel activo del ARNr se exponen en este artículo.

### Experimentos

Para estudiar la actividad catalítica de los ARNr, Noller y sus colaboradores usaron un modelo de reacción simplificado para comprobar la actividad peptidil transferasa. Esta reacción mide la transferencia de moléculas de *N*-formilmetionina marcadas con isótopos radiactivos desde un fragmento de ARNt al grupo amino de la puromicina, un antibiótico que se asemeja a un aminoacil ARNt y puede formar enlaces peptídicos con cadenas peptídicas en crecimiento. La ventaja de este modelo de reacción peptidil transferasa es que puede llevarse a cabo por la subunidad ribosómica 50S aislada, mientras que no se requiere la presencia de la subunidad pequeña, ni de otros factores de proteínas ni de ARNm.

Los investigadores probaron el papel del ARNr ensayando la actividad peptidil transferasa de la subunidad 50S, de la cual se eliminó el componente de proteínas por procedimientos estandarizados de extracción de proteínas. Un aspecto importante de estos experimentos fue el uso de ribosomas aislados de la bacteria *Thermus aquaticus*. Debido a que este microorganismo es capaz de vivir a altas temperaturas, la estructura de su ARNr es significativamente más estable que el ARNr de *E. coli*. El resultado que se obtuvo fue que la actividad peptidil transferasa de los ribosomas de *T. aquaticus* era completamente resistente a métodos de extracción drásticos, utilizando detergentes, proteasas o fenol (véase figura). Más notable fue el mantenimiento total de la actividad peptidil transferasa incluso tras una segunda extracción que eliminó el 95 % del componente de proteínas. En contraste, se vio que la peptidil transferasa era altamente sensible a tratamientos suaves con ARNasa. Aunque estos experimentos no pueden excluir un posible papel de las proteínas remanentes que no se han eliminado por los procedimientos de extracción utilizados, se constató la participación directa del ARNr 23S en la reacción peptidil transferasa.



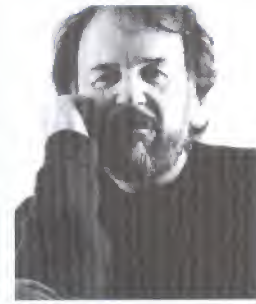

La reacción peptidil transferasa se ensaya mediante la formación de *N*-formilmetionina-puromicina radiactiva (f-Met-puro), detectada mediante electroforesis y posterior autorradiografía. Los ribosomas de *T. aquaticus* son sometidos a técnicas de extracción de proteínas o tratamiento con ARNasa, como se indica en la fotografía.

enlace peptídico amplía la actividad catalítica del ARN, desde su capacidad de auto-replicación hasta una participación directa en la síntesis de proteínas. Estudios adicionales demuestran que el ARNr de *Tetrahymena* puede catalizar la unión de los aminoácidos al ARN, lo que da crédito a la posibilidad de que las aminoacil ARNt sintetasas primigenias estuvieran formadas por ARN y no por

## *Papel catalítico del ARN ribosómico* (continuación)

### Impacto

Los resultados de los experimentos de Noller han sido confirmados y ampliados por los estudios de Kimitsuna Watanaba y sus colaboradores (Nitta *et al.*, *Science* 281:666-669, 1998) demostrando que fragmentos de ARN ribosómico 23S, en ausencia total de proteínas ribosómicas, pueden catalizar la formación del enlace peptídico. Estos resultados no dejaron ninguna duda de la actividad catalítica del ARN en esta reacción, demostrando que la reacción principal de la síntesis de proteínas está catalizada por el ARN ribosómico. Estos descubrimientos no sólo han tenido un notable impacto en el conocimiento de la función de los ribosomas sino que también han confirmado la ya descrita actividad catalítica de las moléculas de ARN y han proporcionado nuevos datos a la hipótesis que defiende el origen de la vida en un mundo poblado de moléculas de ARN con capacidad de autorreplicación. Esta hipótesis se basó en la capacidad de las moléculas de ARN de catalizar aquellas reacciones necesarias para su propia replicación. Este descubrimiento de la actividad catalítica del ARN en la síntesis de proteínas ha proporcionado un claro nexo entre el mundo de las moléculas de ARN y el flujo de la información genética en los organismos celulares actuales, siendo el ARNr el que lleva a cabo la reacción clave en la formación del enlace peptídico.



Harry F. Noller

proteínas. La capacidad de las moléculas de ARN para catalizar las reacciones necesarias para la síntesis de proteínas además de su autoreplicación puede ser un paso clave para entender la evolución de las células.

## *Organización de los ARNm mensajeros e inicio de la traducción*

Aunque los mecanismos de la síntesis de proteínas en células procariotas y eucariotas son similares, hay algunas diferencias, en particular en las señales que determinan el sitio del ARNm molde a partir del que se debe iniciar la síntesis de una cadena polipeptídica (Fig. 7.7). La traducción no empieza simplemente en el extremo 5' del ARNm, sino que tiene lugar en un sitio de iniciación específico. La región 5' terminal de los ARNm de procariotas y eucariotas son secuencias no codificadoras, conocidas como regiones **5' no codificantes**. Los ARNm de eucariotas normalmente codifican una única cadena polipeptídica, mientras que la mayoría de los ARNm de procariotas codifican múltiples poli-

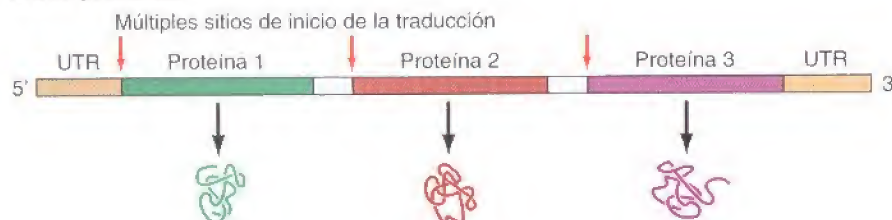






*Figura 7.7*
**ARNm mensajeros procariotas y eucariotas.** Tanto los ARNm procariotas como eucariotas contienen en su extremo 5' y 3' regiones que no se traducen (UTRs). Los ARNm eucariotas también contienen una cap (caperuza) de 7-metilguanosina ($m^7G$) en el extremo 5', y en el extremo 3' la cola poli-A. Los ARNm procariotas normalmente son policistrónicos: éstos codifican múltiples proteínas, que se traducen desde sitios de iniciación independientes. Los ARNm eucariotas son, generalmente, monocistrónicos y codifican sólo una proteína.

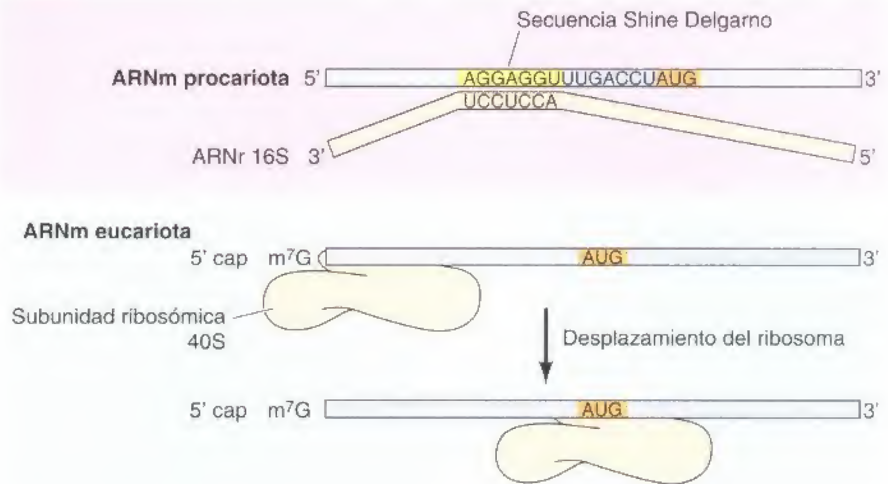



*Figura 7.8*
**Señales de inicio de la traducción.** El lugar de iniciación en los ARNm de procariotas es una secuencia llamada secuencia Shine-Delgarno que precede al codón de iniciación AUG. La complementariedad de bases entre la secuencia Shine-Delgarno y la secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3' alinea el ARNm con el ribosoma. En las células eucariotas el ARNm se une a la subunidad 40S del ribosoma por la caperuza de 7-metilguanosina en el extremo 5'. Entonces el ribosoma se desplaza por el ARNm hasta encontrar un codón de iniciación AUG.

péptidos, sintetizados de manera independiente desde distintos sitios de iniciación. Por ejemplo, el operón *lac* de *E. coli* está formado por 3 genes traducidos a partir de un único ARNm (véase Fig. 6.9). Los ARNs mensajeros que codifican varios polipéptidos se llaman **policistrónicos**, mientras que son **monocistrónicos** los ARNs mensajeros que codifican un único polipéptido. Finalmente, tanto los ARNm de procariotas como eucariotas terminan en **regiones 3' no codificantes**.

Tanto en células eucariotas como procariotas, la traducción siempre comienza con el aminoácido metionina, normalmente codificado por el triplete AUG. En algunas bacterias existen codones de iniciación alternativos, como GUG, pero cuando esto ocurre al principio de una cadena polipeptídica, estos codones incorporan metionina en lugar del aminoácido que codifican normalmente (GUG generalmente codifica para valina). En la mayoría de las bacterias, la síntesis de proteínas se inicia con un residuo de metionina modificado (*N*-formilmetionina), mientras que la metionina sin modificar inicia la síntesis en eucariotas (con excepción de las mitocondrias y cloroplastos, orgánulos cuyos ribosómicas tienen muchas semejanzas con los ribosómicas de bacterias).

Las señales que identifican el codón de iniciación son distintas en células procariotas y eucariotas, debido a las diferencias que existen entre los ARNm policistrónicos y monocistrónicos (Fig. 7.8). Los codones de iniciación en los ARNm bacterianos son precedidos por una secuencia específica (llamada **secuencia Shine-Delgarno**, en honor a sus descubridores) complementaria de una secuencia del ARNr 16S cerca del extremo 3', que aproxima el ARNm al ribosoma para que tenga lugar la traducción. Este apareamiento de bases complementarias permite a los ribosómicas de bacterias iniciar la traducción no sólo en el extremo 5' del ARNm, sino también en sitios de inicio dentro de los mensajeros policistrónicos. A diferencia de procariotas, en células eucariotas los ribosómicas se unen al ARNm mediante el reconocimiento de la 7-metilguanosina en el extremo 5' cap (véase Fig. 6.41). De esta forma los ribosómicas se desplazan por la secuencia del mensajero hasta encontrar un codón de iniciación AUG. Las secuencias que flanquean a los tripletes AUG influyen en la eficacia de la iniciación; así en muchos casos el primer AUG en el ARNm no es reconocido y la traducción comienza en otro triplete AUG más alejado del extremo 5'. Sin embargo, los ARNm eucariotas no tienen secuencias equivalentes a la secuencia Shine-Delgarno de los ARNm procariotas. La traducción de aquellos se inicia en un sitio determinado por el desplazamiento del ribosómica a partir del extremo 5', lo que concuerda con el carácter monocistrónico del mensaje que codifica un único polipéptido.

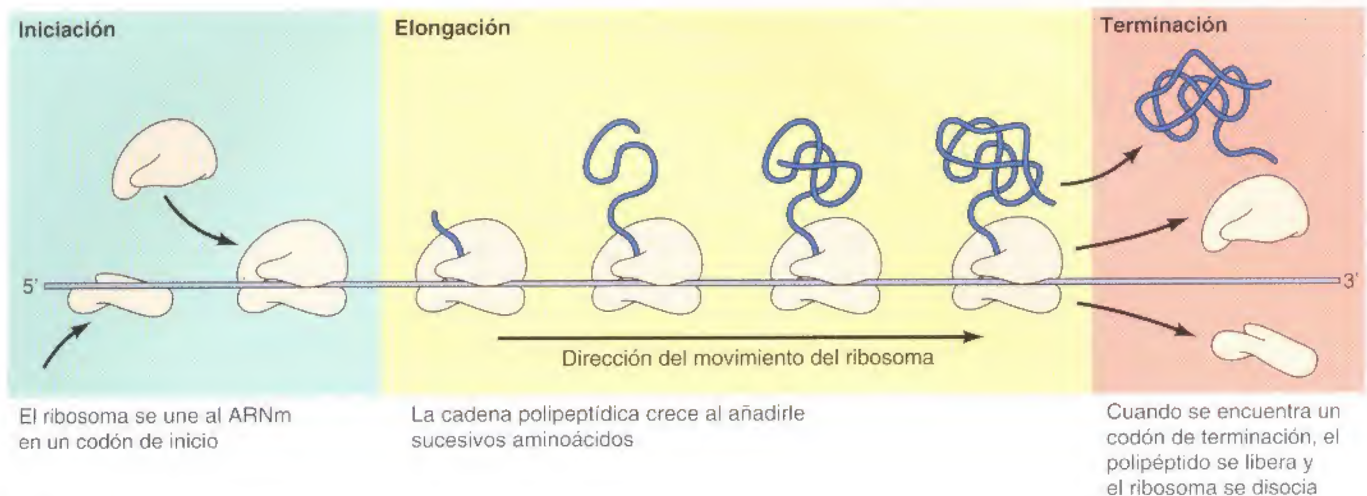



*Figura 7.9*
**Esquema de la traducción.**

## *Mecanismo de la traducción*

La traducción generalmente se divide en 3 etapas: iniciación, elongación y terminación (Fig. 7.9). La cadena polipeptídica crece al añadirle sucesivos aminoácidos. Cuando se encuentra un codón de terminación, el polipéptido se libera y el ribosómica se disocia. Tanto en procariotas como eucariotas lo primero que ocurre en la etapa de iniciación es la unión de un metionil ARNt iniciador y de la cadena de ARNm a la subunidad pequeña del ribosómica. La subunidad grande se unirá posteriormente al complejo, formando un ribosómica funcional que permite el crecimiento de la cadena polipeptídica. Un gran número de proteínas accesorias no ribosómicas son necesarias para las distintas etapas del proceso de traducción (Tabla 7.1).

El primer paso de la traducción en bacterias es la unión de tres **factores de iniciación** (IF-1, IF-2 e IF-3) a la subunidad ribosómica 30S (Fig. 7.10). El ARNm y el N-formilmetionil ARNt iniciador se unen posteriormente al complejo, siendo el factor IF-2 (el cual une GTP) el que específicamente reconoce al ARNt iniciador. Entonces IF-3 se libera permitiendo que la subunidad ribosómica 50S se asocie al complejo. Esta asociación provoca la hidrólisis de GTP unido a IF-2, lo que permite la salida de los factores IF-1 e IF-2 (ahora unido a GDP). El resultado es la formación de un complejo de iniciación 70S (compuesto por ARNm y ARNt iniciador unidos al ribosoma) preparado para catalizar la formación de un enlace peptídico durante la etapa de elongación de la traducción.

La etapa de iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas es un proceso mucho más complejo y requiere al menos 10 proteínas distintas (cada una de las cuales está formada por múltiples cadenas polipeptídicas), llamadas eIFs (*f*actores de *i*niciación *e*ucarióticos, véase Tabla 7.1). Los factores eIF-1, eIF-1A, eIF-3 y eIF-5 se unen a la subunidad ribosómica 40S, y eIF-2 (en un complejo

**TABLA 7.1.** Factores de traducción

| Función | Procariotas | Eucariotas |
|---|---|---|
| Iniciación | IF-1, IF-2, IF-3 | eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5 |
| Elongación | EF-Tu, EF-Ts, EF-G | eEF-1α, eEF-1βγ, eEF-2 |
| Terminación | RF-1, RF-2, RF-3 | eRF-1, eRF-3 |



## Medicina molecular

# Antibióticos y síntesis de proteínas

### La enfermedad

Las bacterias son responsables de una gran variedad de infecciones potencialmente letales, incluyendo la tuberculosis, neumonía bacteriana meningitis infantil, infecciones de heridas y quemaduras, sífilis y gonorrea. Con anterioridad a 1940, los clínicos no contaban con tratamientos efectivos para este tipo de infecciones. En esa época, se pusieron a disposición los primeros antibióticos para uso clínico. Las infecciones que en un principio eran intratables se hicieron curables, y el aumento significativo de la esperanza de vida se atribuyó a la introducción de los antibióticos en la práctica médica. Más de un centenar de antibióticos distintos están actualmente en uso como tratamiento efectivo para las infecciones bacterianas.

### Bases moleculares y celulares

Para ser clínicamente efectivo, un antibiótico debe matar o al menos inhibir el crecimiento bacteriano sin causar toxicidad en el organismo humano. Así, la mayoría de los antibióticos utilizados en la clínica diaria, están dirigidos contra estructuras moleculares presentes en bacterias pero no en las células humanas. La penicilina, por ejemplo, inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana (véase Cap. 12). Sin embargo, muchos otros antibióticos comúnmente usados, inhiben diferentes etapas de la síntesis de proteínas (véase tabla). Algunos de estos antibióticos —incluyendo la estreptomicina, tetraciclina, cloramfenicol y eritromicina— son específicos de ribosomas procariotas y por tanto efectivos como agentes para el tratamiento antibacteriano. Otros antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas actúan contra procariotas y eucariotas (p. ej., puromicina) o contra eucariotas solamente (p. ej., cicloheximida). Aunque estos antibióticos obviamente no se usan clínicamente, sí han servido como importantes herramientas de experimentación para estudios de la síntesis de proteínas tanto en células procariotas como eucariotas.

### Prevención y tratamiento

El uso de los antibióticos ha tenido una repercusión muy importante en la medicina moderna por la capacidad de los clínicos para curar infecciones bacterianas que amenazan la vida. Sin embargo, desafortunadamente las mutaciones permiten el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Muchas cepas bacterianas son en la actualidad resistentes a uno o más antibióticos, por tanto los clínicos en ocasiones deben ensayar distintas terapias antes de encontrar el antimicrobiano efectivo. Además, el desarrollo y multiplicación de las cepas bacterianas resistentes ha hecho que algunos antibióticos queden obsoletos. Un tema más preocupante es la aparición de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, y algunas de estas cepas, que con frecuencia se aíslan en el ámbito hospitalario, son resistentes a casi todos los antibióticos conocidos. Con esto aumenta el espectro de infecciones no tratables debido a la multiplicación de las bacterias resistentes a los antibióticos —una situación que nos dirige de nuevo a la era pre-antibiótica de las enfermedades infecciosas—. El control de estas bacterias resistentes ya sea mediante el uso adecuado de los antibióticos disponibles o por el desarrollo de nuevos antimicrobianos, es un tema de gran importancia en la práctica médica actual.

Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas

| Antibiótico | Célula diana | Efecto |
|---|---|---|
| Estreptomicina | Procariota | Inhibe la iniciación y provoca un error de lectura |
| Tetraciclina | Procariota | Inhibe la unión de los aminoacil ARNt |
| Cloramfenicol | Procariota | Inhibe la actividad peptidil transferasa |
| Eritromicina | Procariota | Inhibe la translocación |
| Puromicina | Procariota y eucariota | Causa terminación prematura de la síntesis de proteínas |
| Cicloheximida | Eucariota | Inhibe la actividad peptidil transferasa |

con GTP) se asocia con el metionil ARNt iniciador (Fig. 7.11). El ARNm es reconocido y dirigido hacia el ribosoma por los factores eIF-4. El cap del extremo 5'del ARNm es reconocido por el eIF-4E. Otro factor, el eIF-4G, se une al factor eIF-4E y a una proteína asociada a la cola poli-A en el extremo 3' del ARNm (proteína de unión a poli-A o PABP). Por tanto los factores de iniciación eucariotas reconocen tanto el extremo 5' como 3' del ARNm, siendo responsables del efecto estimulador de la poliadenilación en la traducción. Los factores de iniciación eIF-4E y eIF-4G en asociación con eIF-4A y eIF-4B dirigen el ARNm hacia la subunidad ribosómica 40S, mediante interacción entre los factores eIF-4G y

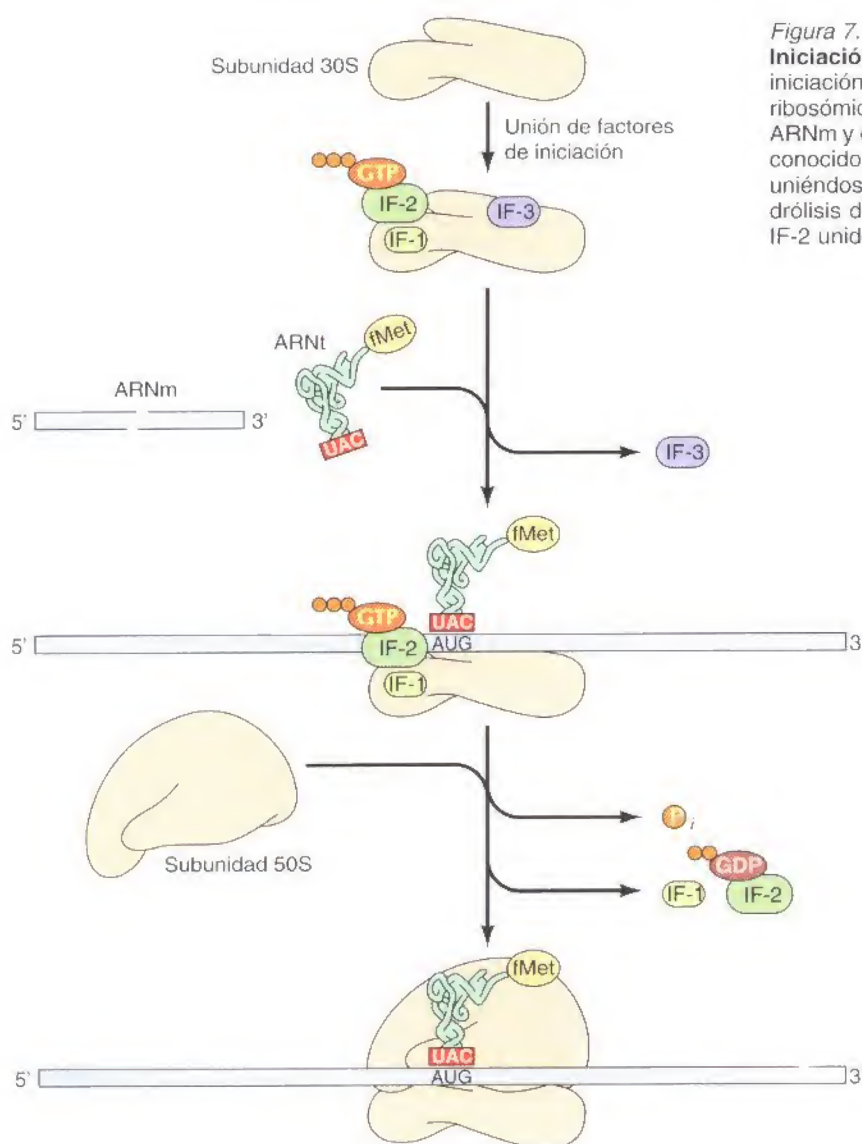



*Figura 7.10*
**Iniciación de la traducción en bacterias.** Tres factores de iniciación (IF-1, IF-2 e IF-3) se unen primero a la subunidad ribosómica 30S. Esta etapa es seguida por la unión del ARNm y el *N*-formilmetionil ARNt iniciador (fMet), que es reconocido por IF-2 unido a GTP. El factor IF-3 se libera, uniéndose la subunidad 50S al complejo. Esto permite la hidrólisis del GTP unido, seguido por la liberación de IF-1 e IF-2 unido a GDP.

eIF-3. La subunidad ribosómica 40S unida al metionil ARNt y a los eIFs chequea el ARNm hasta identificar un codón de iniciación AUG. Cuando el codón AUG es reconocido, eIF-5 provoca la hidrólisis del GTP unido a eIF-2. Los factores de iniciación (incluyendo eIF-2 unido a GDP) son liberados, y la subunidad 60S se une a la subunidad 40S para formar el complejo de iniciación 80S de las células eucariotas.

Tras la formación del complejo de iniciación, la traducción continúa con la elongación de la cadena polipeptídica. El mecanismo de la elongación en células procariotas y eucariotas es muy similar (Fig. 7.12). El ribosoma tiene tres sitios para la unión del ARNt, denominados lugar P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El metionil ARNt iniciador se une al sitio P. La primera etapa de la elongación es la unión del siguiente aminoacil ARNt al sitio A mediante emparejamiento con el segundo codón del mensajero. El aminoacil ARNt es guiado hacia el ribosoma por un **factor de elongación** (EF-Tu en procariotas y eEF-1$\alpha$ en eucariotas), unido a GTP. La selección del aminoacil ARNt para su incorporación en la cadena polipeptídica creciente es un paso crítico que determina la precisión de la síntesis proteica. A pesar de que esta selección se basa en la complementariedad de bases entre el codón del ARNm y el anticodón en el ARNt, el apareamiento de las bases no es suficiente para responsabilizarse de

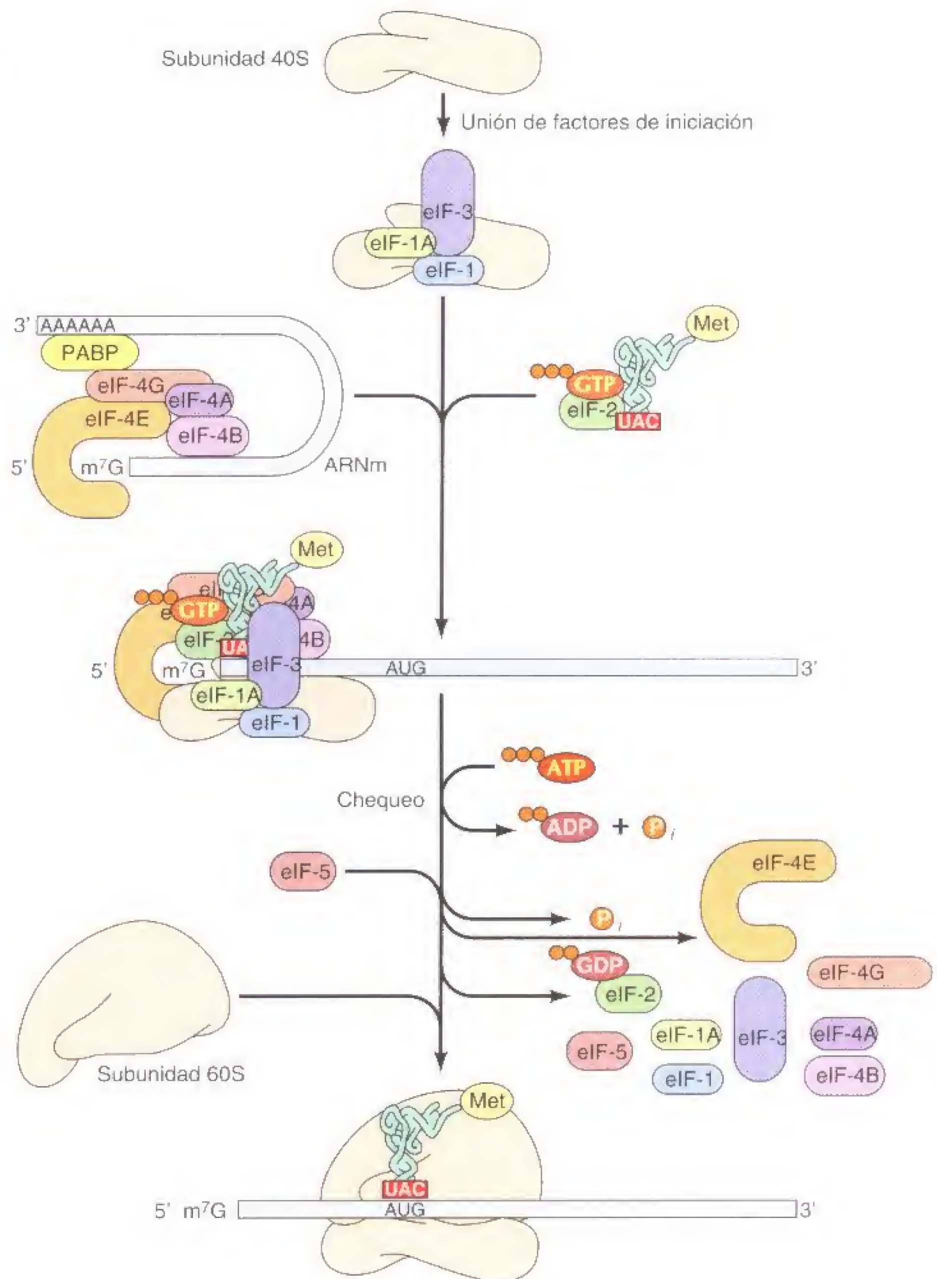



*Figura 7.11*
**Iniciación de la traducción en células eucariotas.** Los factores de iniciación eIF-3, eIF-1 y eIF-1A se unen a la subunidad ribosómica 40S. El metionil ARNt iniciador es llevado al ribosoma por eIF-2 (formando un complejo con GTP), y el ARNm por eIF-4 (el cual se une al cap del extremo 5'), eIF-4G (unido a eIF-4E en el cap del extremo 5' y a PABP en la cola poli-A en el extremo 3'), eIF-4A y eIF-4B. El ribosoma ahora chequea el ARNm para identificar el primer codón de iniciación AUG. Este reconocimiento requiere energía que es proporcionada por la hidrólisis de ATP. Cuando el codón AUG de iniciación es reconocido, eIF-5 provoca la hidrólisis de GTP unido a eIF-2, seguido de la liberación de eIF-2 (unido a GDP) y otros factores de iniciación. Ahora la subunidad 60S del ribosoma forma un complejo con la subunidad 40S.

la precisión de la síntesis de proteínas, que posee una tasa de error inferior a $10^{-3}$. Esta precisión la proporciona un «centro descodificador» en la subunidad pequeña del ribosoma, que reconoce los pares de bases codón-anticodón correctos y discimina los errores. La inserción de un aminoacil ARNt correcto en el dominio A da lugar a un cambio conformacional que induce la hidrólisis del GTP unido a EF-Tu y la liberación del factor de elongación unido a GDP. Un resultado notable de los estudios estructurales recientes del ribosoma es que el reconocimiento del apareamiento codón-anticodón correcto en el centro descodificador, como la actividad peptidil transferasa, se basa principalmente en la actividad del ARN ribosómico en lugar de las proteínas.

Una vez que EF-Tu (o eEF-1$\alpha$) ha salido del ribosoma, se forma un enlace peptídico entre el metionil ARNt iniciador en el sitio P y el segundo aminoacil ARNt en el sitio A. Esta reacción está catalizada por la subunidad ribosómica grande, realizando esta actividad el ARNr (como ya se ha explicado). El resultado es la transferencia de la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A del riboso-

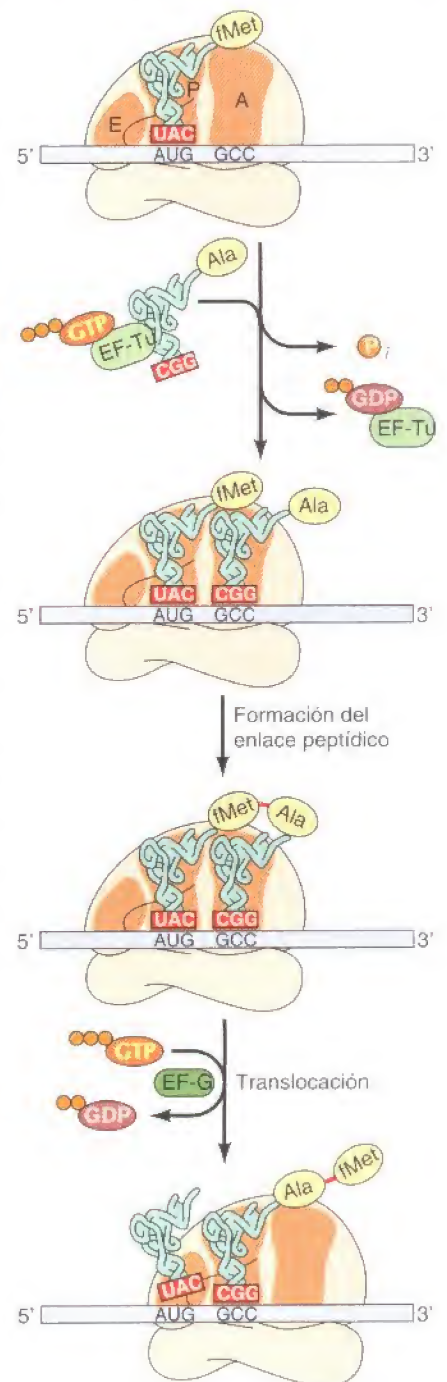



*Figura 7.12*
**Etapa de elongación de la traducción.** El ribosoma tiene tres sitios de unión al ARNt, llamados P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). El *N*-formilmetionil ARNt iniciador se sitúa en el sitio P, dejando un sitio A libre. El segundo aminoacil ARNt (p.ej., alanil ARNt) es dirigido hacia el sitio A por EF-Tu (unido a GTP). Tras la hidrólisis de GTP, EF-Tu (unido a GDP) sale del ribosoma, dejando al alanil ARNt situado en el sitio A. Se forma el enlace peptídico y se transfiere la metionina al aminoacil ARNt en el sitio A. Entonces el ribosoma se desplaza tres nucleótidos a lo largo del ARNm. Este movimiento transloca el peptidil (Met-Ala) ARNt al sitio P y al ARNt libre al sitio E, dejando un sitio A vacío para la unión de un nuevo aminoácido. La translocación está mediada por EF-G, acoplada a la hidrólisis de GTP. El proceso en células procariotas se ilustra en el esquema, siendo muy similar al de eucariotas. (En la Tabla 7.1 se nombran los factores de elongación de eucariotas.)

ma, formándose un peptidil ARNt en esta posición y dejando un ARNt libre en el sitio P. La etapa que sigue a la elongación es la translocación, que requiere otro factor de elongación (EF-G en procariotas y eEF-2 en eucariotas), y también está acoplada a la hidrólisis de GTP. Durante la translocación, el ribosoma se desplaza tres nucleótidos sobre el ARNm, colocándose un nuevo codón en un sito A libre. En esta etapa se transloca el peptidil ARNt desde el sitio A al sitio P, y el ARNt libre desde el sitio P al sitio E. De esta manera el ribosoma tiene un peptidil ARNt en el sitio P y un sitio A vacío. La unión de un nuevo aminoacil ARNt al sitio A induce la liberación del ARNt libre del sitio E, dejando al ribosoma preparado para la inserción de otro aminoácido a la cadena polipeptídica en crecimiento.

El proceso de elongación debe continuar y para ello EF-Tu (o eEF-1$\alpha$) que es liberado del ribosoma unido a GDP, se debe convertir de nuevo en la forma unida a GTP (Fig. 7.12). Esta conversión requiere la presencia de un tercer factor de elongación, EF-Ts (eEF-1$\beta\gamma$ en eucariotas), que se une a EF-Tu/GDP promoviendo la sustitución de GDP por GTP. Con este cambio se regenera un nuevo EF-Tu/GTP preparado para dirigir un nuevo aminoacil ARNt al sitio A del ribosoma, comenzando un nuevo ciclo de elongación. La regulación del factor EF-Tu por la unión a GTP y la hidrólisis de éste es un ejemplo de regulación de actividad de proteínas. Como se explicará en capítulos posteriores, mecanismos similares de control de la actividad ocurren en una gran variedad de proteínas que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares, así como en el transporte y secreción de proteínas.

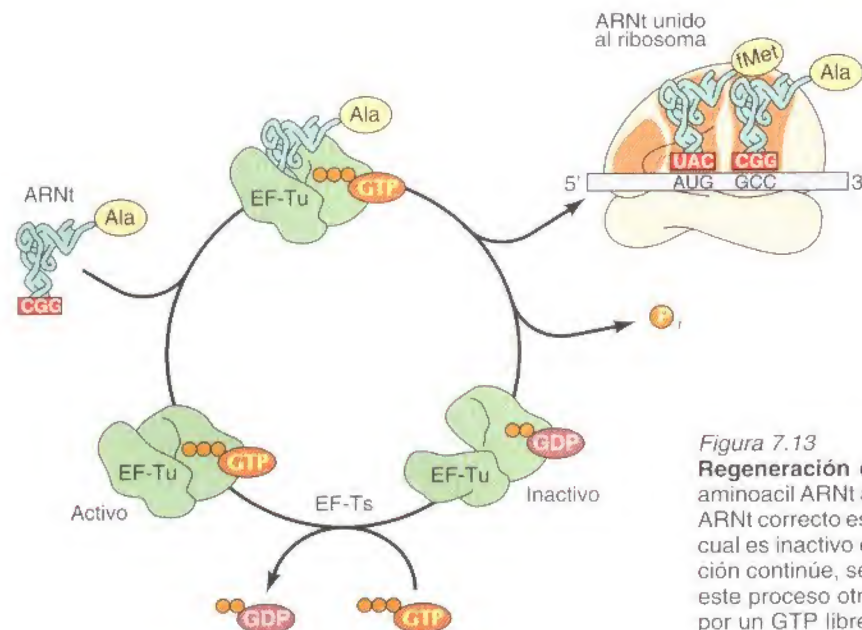



*Figura 7.13*
**Regeneración de EF-Tu/GTP.** El complejo EF-Tu/GTP dirige el aminoacil ARNt al ribosoma. El GTP unido es hidrolizado cuando el ARNt correcto es insertado, liberándose el complejo EF-Tu/GDP, el cual es inactivo e incapaz de unir otro ARNt. Para que la translocación continúe, se debe regenerar otro EF-Tu/GTP, participando en este proceso otro factor, EF-Ts, que facilita la sustitución de GDP por un GTP libre.

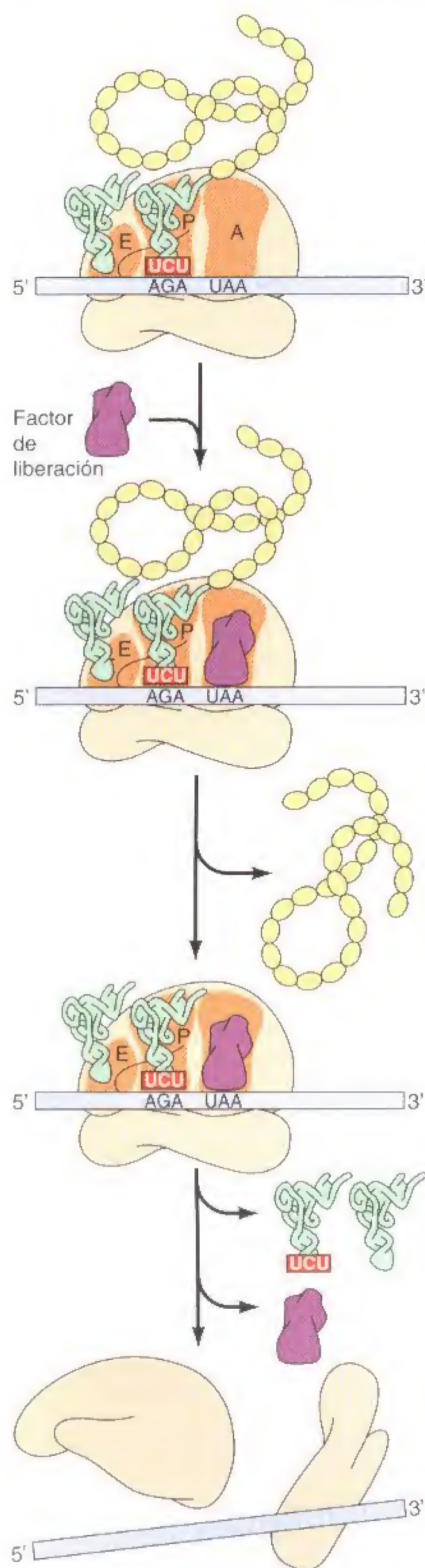



*Figura 7.14*
**Terminación de la traducción.** Un codón de terminación (p. ej., UAA) en el sitio A es reconocido por un factor de liberación en vez de por un ARNt. El resultado es la liberación de la cadena polipeptídica completa, seguido de la disociación del ARNt y ARNm del ribosoma.

La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación (UAA, UAG o UGA) se coloca en el sitio A del ribosoma. Las células no contienen ARNt con anticodones complementarios de los tripletes de terminación, pero sí tienen **factores de liberación** que los reconocen y terminan la síntesis de proteínas (Fig. 7.14). Las células procariotas cuentan con dos factores de liberación que reconocen los codones de terminación: RF-1 reconoce UAA o UAG y RF-2 reconoce UAA o UGA (véase Tabla 7.1). En células eucariotas un único factor de liberación (eRF-1) reconoce los tres codones de terminación. Además las células procariotas y eucariotas también tienen factores de liberación (RF-3 y eRF-3 respectivamente) que no reconocen codones de terminación específicos pero actúan con RF-1 (o eRF-1) y RF-2. El factor de liberación se une a un codón de terminación en el sitio A estimulando la hidrólisis del enlace entre el ARNt y la cadena polipeptídica en el sitio P, permitiendo la salida de ésta del ribosoma. El ARNt es liberado posteriormente, disociándose las subunidades ribosómicas y la hebra de ARNm.

Los ARN mensajeros de células procariotas y eucariotas pueden ser traducidos simultáneamente por muchos ribosomas. Una vez que el ribosoma se aleja de un sitio de iniciación, otro puede unirse al ARNm e iniciar la síntesis de una nueva cadena polipeptídica. Así los ARNm son normalmente traducidos por una serie de ribosomas, separados entre ellos por aproximadamente 100-200 nucleótidos (Fig. 7.15). El conjunto de ribosomas unido a una molécula de ARNm se llama polirribosoma o **polisoma**. Cada ribosoma del polisoma funciona de manera independiente para sintetizar una cadena polipeptídica distinta.

## *Regulación de la traducción*

Aunque la transcripción es el nivel principal de control de la expresión génica, la traducción del ARNm también está regulada tanto en células procariotas como eucariotas. Un mecanismo de regulación traduccional es la unión de proteínas represoras, que bloquean la traducción, a secuencias específicas del ARNm. El ejemplo mejor conocido de este mecanismo en células eucariotas es la regulación de la síntesis de ferritina, una proteína que almacena hierro dentro de la célula. La traducción del ARNm que codifica para ferritina está regulada por las reservas de hierro: se sintetiza más ferritina cuanto más hierro haya (Fig. 7.16). Esta regulación está mediada por una proteína que (en ausencia de hierro) se une a una secuencia (secuencia de respuesta al hierro o IRE) en el extremo 5' no codificante del ARNm de la ferritina, bloqueando la traducción. En presencia de hierro el represor ya no se puede unir a la secuencia IRE, produciéndose la traducción de la ferritina.

Es interesante observar que la regulación de la traducción del ARNm de la ferritina por el hierro es similar a la regulación de la estabilidad del ARNm que codifica para el receptor de transferrina, comentada en el capítulo anterior (véase Fig. 6.51), donde se explicó que la regulación de la estabilidad del ARNm del receptor de transferrina se debe a la unión de una proteína a una secuencia IRE en la región 3' no codificante. La misma proteína se une a las secuencias IRE de ambos ARNm. Sin embargo, las consecuencias de la unión de esta proteína a ambas secuencias IRE son muy diferentes. La proteína unida al IRE del ARNm para el receptor de transferrina protege al ARNm de la degradación en vez de inhibir su traducción. Este efecto es quizá el resultado de la diferente localización de la secuencia IRE en ambos ARNm. Para actuar como un lugar de unión a represor, la secuencia IRE se debe localizar a unos 70 nucleótidos del cap del

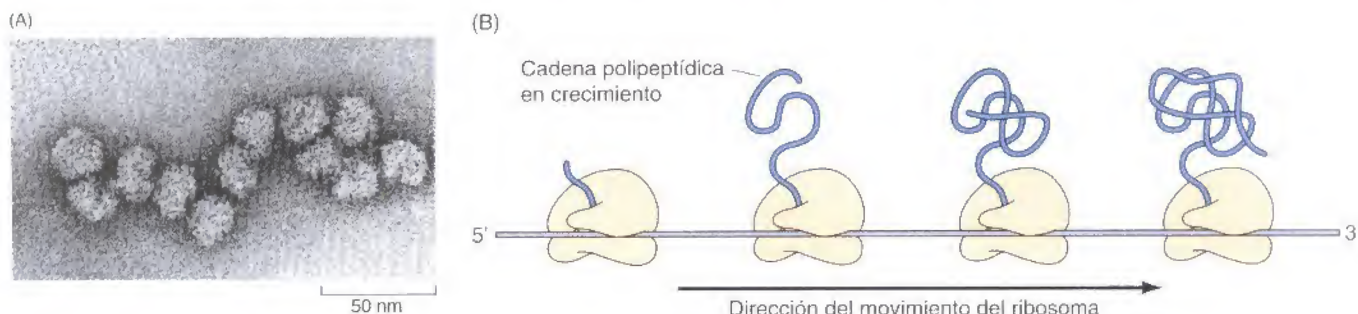



*Figura 7.15*
**Polisomas.** Los ARNs mensajeros son traducidos por múltiples ribosomas formando un polisoma. (A) Micrografía electrónica de un polisoma eucariota. (B) Esquema general de un polisoma. Nótese que los ribosomas próximos al extremo 3' del ARNm contienen cadenas polipeptídicas más largas. (A, de M. Boublik *et al.*, 1990. *The Ribosome*, pág. 117. Cortesía de American Society for Microbiology.)

extremo 5' del ARNm de la ferritina, sugiriendo que la unión de esta proteína a la secuencia IRE bloquea la traducción por impedir que la subunidad ribosómica 40S reconozca y se una al cap del extremo 5'. En vez de inhibir la traducción, la unión de la proteína a la misma secuencia en el extremo 3' del ARNm para la transferrina, protege al ARNm de la degradación por nucleasas. La unión de la misma proteína reguladora a diferentes sitios en las moléculas de ARN puede tener efectos distintos en la expresión génica; en un caso inhibiendo la traducción y en otro estabilizando el ARNm para aumentar la síntesis de proteínas.

La regulación traduccional es especialmente importante durante el desarrollo temprano. Como se ha estudiado en el Capítulo 6, una variedad de ARNm está almacenado en los óvulos en forma no traducida; la traducción de estos ARNm almacenados es activada durante la fertilización o durante estadios posteriores del desarrollo. Un mecanismo de regulación de la traducción de este tipo está controlado por la poliadenilación de los ARNm del óvulo. Muchos ARNm son almacenados sin traducir en los óvulos con pequeñas colas de poliA (aproximadamente 20 nucleótidos). Estos ARNm almacenados serán posteriormente reclutados para la traducción en el estadio apropiado del desarrollo por el alargamiento de sus colas de poliA hasta varios cientos de nucleótidos. Adicionalmente, la traducción de algunos ARNm durante el desarrollo parece estar regulada por proteínas represoras que se unen a secuencias específicas de sus regiones 3'.

Las proteínas que se unen a las regiones 3' de los ARNm sin traducir son también responsables de localizar los ARNm a regiones específicas de la célula, permitiendo que se produzcan proteínas en localizaciones subcelulares específicas. La localización del ARNm es una parte importante de la regulación de la traducción en una variedad de tipos celulares, incluyendo óvulos, embriones, células nerviosas y fibroblastos en movimiento. Por ejemplo, la localización de ARNm a regiones específicas de los óvulos o embriones juega un papel importante en el desarrollo, permitiendo que las proteinas codificadas sean sintetizadas en los lugares apropiados del embrión en desarrollo (Figura 7.17). La localización de los ARNm está acoplada a la regulación de su traducción, de modo

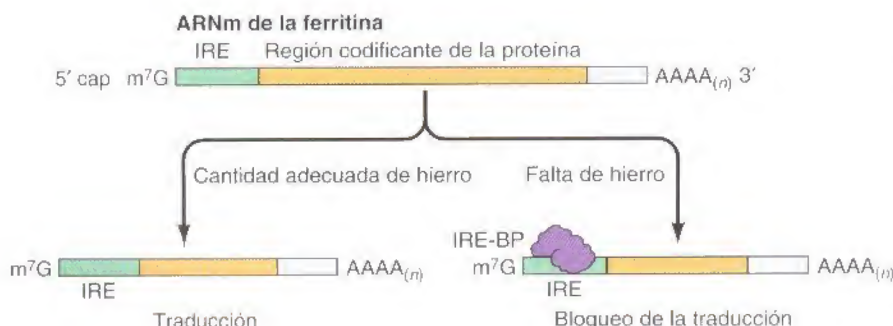



*Figura 7.16*
**Regulación de la traducción de la ferritina.** El ARNm contiene una secuencia de respuesta al hierro (IRE) cerca del cap del extremo 5'. En presencia de una cantidad adecuada de hierro, la traducción del ARNm ocurre normalmente. Sin embargo, si la cantidad de hierro disminuye, una proteína (denominada proteína de unión a la secuencia de respuesta al hierro o IRE-BP) se une a la secuencia IRE bloqueando la traducción del ARNm.




*Figura 7.17*
**Localización del ARNm en ovocitos de *Xenopus*.** Hibridación *in situ* que ilustra la localización del ARNm Xlerk a la corteza vegetal de los ovocitos de *Xenopus*. (Cortesía de James Deshler, Boston University.)

que las proteínas que codifican son sintetizadas cuando el ARNm se localiza correctamente en el estadio del desarrollo apropiado.

Estudios recientes han demostrado que la traducción de ARNm puede ser regulada no sólo por proteínas, sino también por ARNs no codificantes que son homólogos a una porción de la secuencia del ARNm. La mayoría de estos ARNs no codificantes reguladores son pequeñas moléculas de doble hebra que desencadenan la degradación de su ARNm diana mediante un mecanismo de interferencia de ARN (véase Fig. 3.41). El papel de estos ARNs no codificantes ha sido especialmente bien estudiado en plantas, y se han identificado aproximadamente 50 genes cuya traducción es regulada por este mecanismo en *Arabidopsis thaliana*.

Otro mecanismo de regulación traduccional en células eucariotas que tiene un efecto global en la traducción más que un efecto en la traducción de un mensajero específico, ocurre por la modulación de la actividad de los factores de iniciación, en particular eIF-2. Como se explicó anteriormente, eIF-2 (formando complejo con GTP) se une al metionil ARNt iniciador, dirigiéndolo hacia el ribosoma. La liberación de eIF-2 en una etapa posterior va acompañada de la hidrólisis del GTP, liberándose un complejo inactivo eIF-2/GDP. Para participar en otro ciclo de iniciación debe regenerarse eIF-2/GTP, sustituyendose la molécula de GDP por GTP (Fig. 7.18). Este intercambio está mediado por otro factor, eIF-2B. El control de la actividad de eIF-2 por la unión a GTP y la hidrólisis es similar a la que sufre el factor EF-Tu (véase Fig. 7.13). Sin embargo, la regulación de eIF-2 proporciona un punto de regulación crítico en una gran variedad de células eucariotas. En concreto, tanto eIF-2 como eIF-2B pueden ser fosforiladas por proteínas quinasas reguladoras. Estas fosforilaciones inhiben el intercambio del GDP unido por GTP, inhibiendo así la iniciación de la traducción. Por ejemplo, en las células de mamíferos carecientes de factores de crecimiento, se activa una proteína quinasa que fosforila a eIF-2B, inhibiendo la sucesiva síntesis de proteínas.

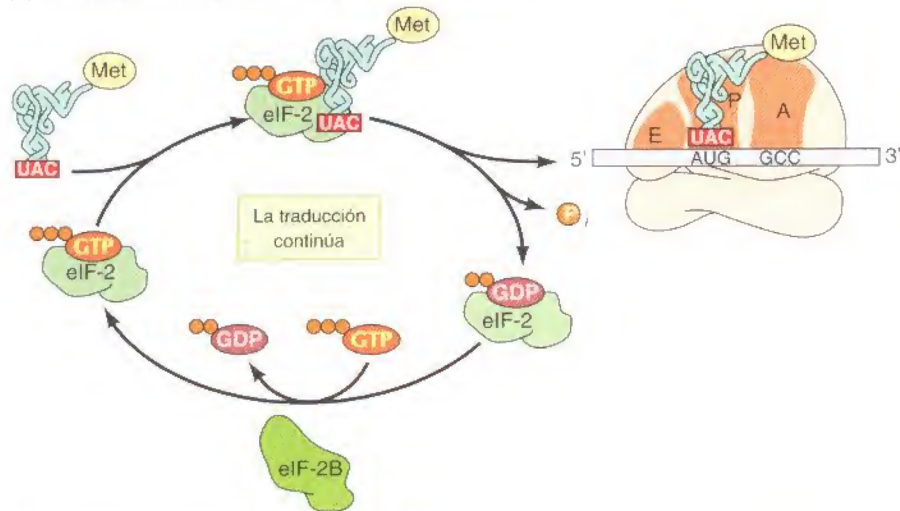
La regulación de la actividad de eIF-4E, que se une a la caperuza 5' del ARNm, es otro punto crítico sobre el que actúan los factores de crecimiento para controlar la síntesis proteica. Por ejemplo, factores de crecimiento que estimulan la síntesis proteica en células de mamífero activan proteínas quinasas que fosforilan a proteínas reguladoras (denominadas proteínas de unión a eIF-4E, o 4E-BPs del inglés *binding proteins*) que a su vez se unen a eIF-4E. En ausencia de los factores de crecimiento apropiados, las 4E-BPs no fosforiladas se unen a eIF-4E e inhiben la traducción interfiriendo en la interacción de eIF-4E con eIF-4G (véase Fig. 7.11). Cuando los factores de crecimiento están presentes en una cantidad adecuada, la fosforilación de las 4E-BPs impide su interacción con eIF-4E, dando lugar a elevaciones de las tasas de iniciación de la traducción.

## Plegamiento y procesamiento de proteínas

La traducción completa el flujo de la información genética en la célula. En este proceso la secuencia de nucleótidos del ADN se convierte en la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La síntesis de un polipéptido, sin embargo, no significa que la proteína sea funcional. Para ser activos, los polipéptidos deben plegarse en conformaciones tridimensionales características y, en muchos casos, varias cadenas polipeptídicas se agregan para dar lugar a un complejo funcional. Además, muchas proteínas experimentan modificaciones adicionales, incluyendo escisión y la unión covalente de carbohidratos y lípidos, que son necesarios para la correcta función y localización de las proteínas en la célula.

### *Chaperonas y plegamiento de proteínas*

La conformación tridimensional de las proteínas depende de la interacción entre las cadenas laterales de sus aminoácidos, como se vio en el Cap. 2. El principio



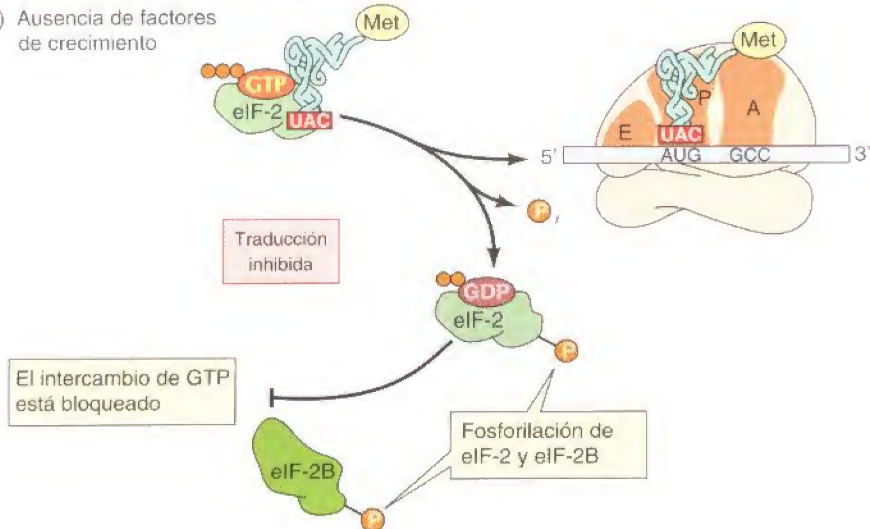




*Figura 7.18*
**Regulación de la traducción mediante fosforilación de eIF-2 y eIF-2B.** La forma activa de eIF-2 (formando un complejo con GTP) dirige el metionil tARN iniciador al ribosoma (ver Figura 7.11). A continuación el eIF-2 es liberado del ribosoma en su forma inactiva unida a GDP. Para continuar la traducción, eIF-2 debe ser reactivada por eIF-2B, que estimula el intercambio de GDP por GTP. La traducción puede ser inhibida (por ejemplo, si las células carecen de factores de crecimiento) por la acción de proteínas quinasas reguladoras que fosforilan a eIF-2 o a eIF-2B. Estas fosforilaciones bloquean el intercambio de GTP por GDP, de modo que eIF-2/GTP no puede ser regenerado.

clásico del plegamiento de una proteína es que la información necesaria para que ésta adopte la conformación tridimensional correcta la proporciona su secuencia de aminoácidos. Este principio fue establecido por los experimentos de Christian Anfinsen demostrando que la enzima ARNasa desnaturalizada puede *in vitro* volver a plegarse en una conformación activa espontáneamente (véase Fig. 2.17). En un principio se pensó que el plegamiento de proteínas ocurría por un proceso de auto-ensamblaje que no requería la presencia de ningún factor celular adicional. Sin embargo, estudios más recientes muestran que esto no es una buena descripción del plegamiento de proteínas en las células y se puede afirmar que en el proceso participan otras muchas proteínas.

Las proteínas que facilitan el plegamiento de otras proteínas se llaman **chaperonas**. El término «chaperona» fue utilizado en un principio por Ron Laskey y sus colaboradores para describir una proteína (nucleoplasmina) necesaria para el ensamblaje de los nucleosomas a partir del ADN y de las histonas. La nucleoplasmina se une a las histonas y provoca su ensamblaje en nucleosomas, pero la nucleoplasmina no forma parte de la estructura última del nucleosoma. Las chaperonas, de este modo, actúan como catalizadores que facilitan el ensamblaje sin formar parte del complejo ensamblado. Estudios más recientes han ampliado el concepto hasta incluir proteínas que median una gran variedad de procesos de ensamblaje, particularmente el plegamiento de proteínas.

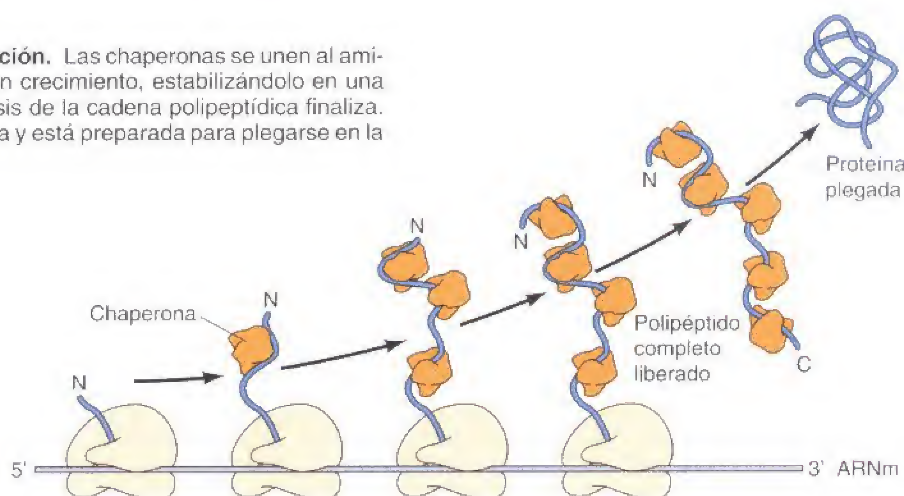



*Figura 7.19*
**Papel de las chaperonas durante la traducción.** Las chaperonas se unen al amino terminal (N) de la cadena polipeptídica en crecimiento, estabilizándolo en una configuración no plegada hasta que la síntesis de la cadena polipeptídica finaliza. La proteína completa es liberada del ribosoma y está preparada para plegarse en la conformación tridimensional adecuada.

Es importante saber que las chaperonas no proporcionan una información adicional para el plegamiento de las proteínas en su conformación tridimensional; ésta viene determinada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos. Más bien, las chaperonas catalizan el plegamiento proteico ayudando al proceso de autoensamblaje. En concreto, se cree que su función es unirse y estabilizar las cadenas polipeptídicas no plegadas o los intermediarios parcialmente plegados que se forman en la ruta que dirige al estado de plegamiento correcto. En ausencia de chaperonas, las cadenas polipeptídicas no plegadas o parcialmente plegadas son inestables en la célula y con frecuencia se pliegan de forma incorrecta o se agregan formando complejos insolubles. La unión de las chaperonas estabiliza estas formas no plegadas y por tanto previenen el plegamiento incorrecto o la formación de agregados y permiten que la cadena polipeptídica adquiera una confomación activa.

Un buen ejemplo lo proporcionan las chaperonas que se unen a las cadenas polipeptídicas nacientes a la vez que se sintetizan en los ribosomas; de este modo previenen el plegamiento incorrecto o la agregación de la porción amino terminal del polipéptido antes de que la síntesis de éste finalice (Fig. 7.19). Probablemente, este tipo de interacción tiene importancia en las proteínas en las que el extremo carboxilo terminal (sintetizado en último lugar) es necesario para el plegamiento del extremo amino terminal. De esta manera la chaperona unida estabiliza la porción amino terminal en una conformación extendida hasta que se sintetice el resto de la cadena polipeptídica y la proteína completa pueda plegarse correctamente. Las chaperonas también estabilizan los polipéptidos no plegados durante su transporte a los orgánulos subcelulares —por ejemplo, durante la migración de proteínas desde el citosol a la mitocondria (Fig. 7.20). Las proteínas se transportan a través de la membrana mitocondrial en una conformación parcialmente plegada estabilizada por chaperonas que se unen en el citosol. Las chaperonas del interior de la mitocondria facilitan la transferencia del polipéptido al atravesar la membrana y su plegamiento posterior en el interior del orgánulo. Además, las chaperonas participan en el ensamblaje de proteínas formadas por múltiples cadenas polipeptídicas, en el ensamblaje de estructuras macromoleculares (p. ej., nucleoplasmina).

Muchas de las proteínas que actúan como chaperonas (Tabla 7.2) fueron inicialmente identificadas como **proteínas de choque térmico** (del inglés *heat-shock proteins*, Hsp), un grupo de proteínas que se expresan en las células ante determinadas circunstancias de estrés ambiental, como por ejemplo temperaturas elevadas. Las proteínas de choque térmico son proteínas altamente conservadas tanto en células procariotas como eucariotas y su función es estabilizar y facilitar el plegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas por exposición a temperaturas elevadas. Sin embargo, muchos miembros de la familia de

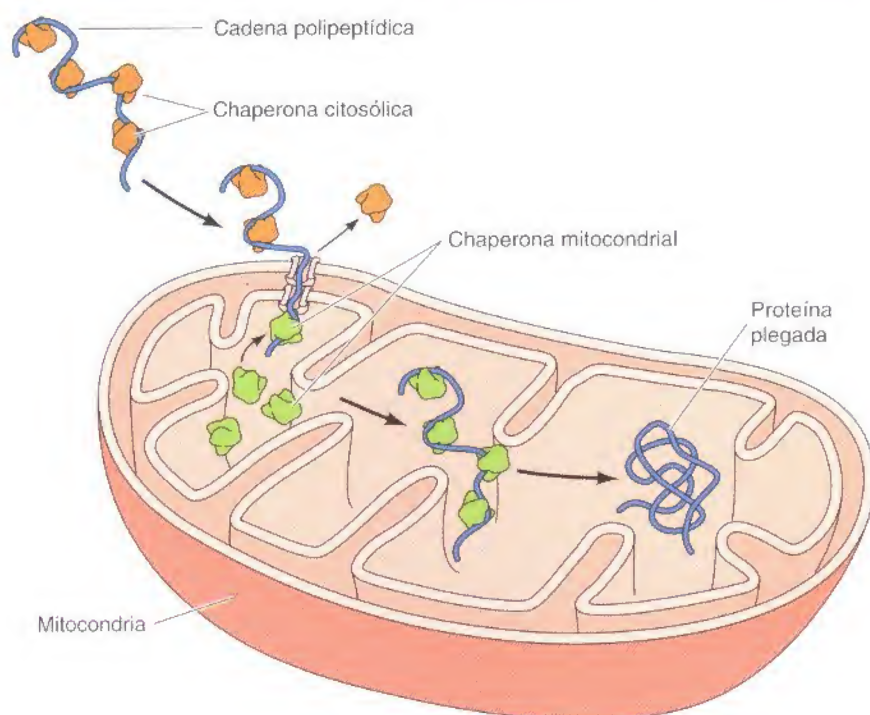



*Figura 7.20*
**Papel de las chaperonas durante el transporte de proteínas.** Un polipéptido parcialmente plegado es transportado desde el citosol a la mitocondria. Las chaperonas citosólicas estabilizan la configuración o conformación extendida. Las chaperonas mitocondriales facilitan el transporte y posterior plegamiento de la cadena polipeptídica dentro del orgánulo.

las proteínas de choque térmico se expresan y tienen funciones fundamentales en condiciones normales de crecimiento celular. Estas proteínas actúan como chaperonas moleculares, necesarias para el plegamiento de los polipéptidos y su transporte en condiciones normales, así como en condiciones de estrés ambiental.

Las familias de proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp60 tienen un papel importante en el mecanismo de ensamblaje de proteínas tanto en células procariotas como eucariotas. Las proteínas de ambas familias funcionan por unión a regiones no plegadas de las cadenas polipeptídicas. Los miembros de la familia Hsp70 estabilizan las proteínas no plegadas durante la traducción (véase Fig. 7.17) y también durante el transporte de los polipéptidos a muchos de los orgánulos subcelulares, como la mitocondria y el retículo endoplásmico. Estas proteínas se unen a pequeños fragmentos (siete u ocho residuos de aminoácidos) de los polipéptidos no plegados, manteniendo la cadena polipeptídica en una configuración o conformación extendida, impidiendo la agregación.

Los miembros de la familia Hsp60 (también llamadas **chaperoninas**) facilitan el plegamiento de las proteínas en su conformación nativa. Cada chaperoni-

**TABLA 7.2.** Chaperonas moleculares

| | Chaperonas | |
|---|---|---|
| **Familia de proteínas** | **Procariotas** | **Eucariotas** |
| Hsp70 | DnaK<br>BiP (retículo endoplásmico)<br>SSC1 (mitocondria)<br>ctHsp70 (cloroplastos) | Hsc73 (citosol) |
| Hsp60 | GroEL<br>Hsp60 (mitocondria)<br>Cpn60 (cloroplastos) | TriC (citosol) |
| Hsp90 | HtpG<br>Grp94 (retículo endoplásmico) | Hsp90 (citosol) |

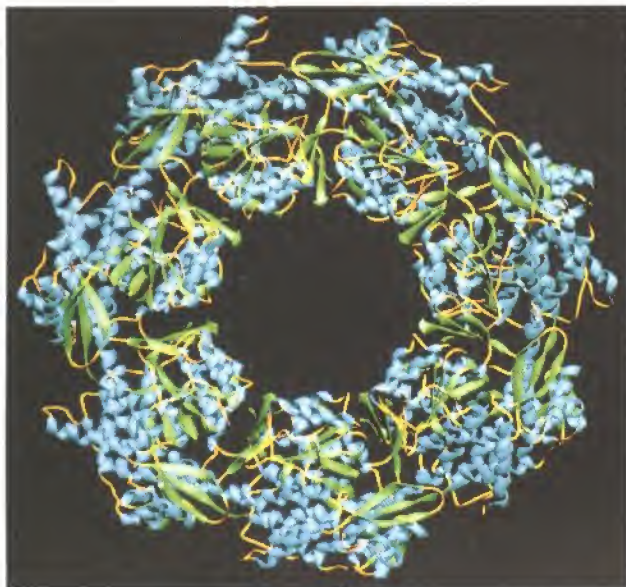


*Figura 7.21*
**Estructura de una chaperonina.** GroEL, una proteína de la familia de las Hsp60, es un cilindro hueco organizado en dos estructuras anulares unidas. Cada anillo está compuesto por siete subunidades. (Cortesía de Paul B. Sigler, Universidad de Yale.)

na está formada por 14 subunidades de aproximadamente 60 Kilodaltons (kDa) cada una, organizadas en anillos apilados para formar una estructura en forma de «doble dónut» (Fig. 7.21). Las cadenas polipeptídicas son protegidas del citosol mediante la unión a la cavidad del cilindro de la chaperonina. En estas condiciones ocurre el plegamiento de proteínas, mientras que la unión de la chaperonina impide la agregación de los segmentos no plegados del polipéptido. La unión de los polipéptidos no plegados a las chaperoninas es una reacción reversible acoplada a la hidrólisis de ATP, como fuente de energía. La hidrólisis de ATP dirige series de liberación y unión de las regiones no plegadas de la proteína a la chaperonina, y de esta manera el polipéptido se pliega gradualmente en una conformación correcta.

En algunos casos, distintos miembros de la familia Hsp70 y Hsp60 actúan juntos de manera secuencial. Por ejemplo, los miembros de la familia de proteínas Hsp70 y Hsp60 actúan de forma secuencial durante el transporte de las proteínas a la mitocondria y durante el plegamiento de proteínas en *E. coli* (Fig. 7.22). Primero, una chaperona Hsp70 estabiliza los polipéptidos nacientes hasta que la síntesis de proteínas finalice. El polipéptido extendido se transfiere a la chaperonina Hsp60, lugar donde el plegamiento de proteínas tiene lugar, apareciendo finalmente una proteína correctamente plegada en la conformación tridimensional funcional. Los miembros de la familia Hsp70 y Hsp60 se distribuyen tanto en el citosol como en el interior de los orgánulos (p. ej., mitocondria) de células eucariotas, y también en células procariotas (véase Tabla 7.2), de manera que el papel secuencial de estas proteínas representa una ruta bioquímica general del plegamiento de proteínas. Un mecanismo alternativo de plegamiento de proteínas en el citosol y en el retículo endoplásmico requiere la actuación secuencial de proteínas Hsp70 y Hsp90. La mayoría de los sustratos para plegamiento por Hsp90 son proteínas que están implicadas en la señalización celular, incluyendo receptores de hormonas esteroideas y una variedad de proteínas quinasas.

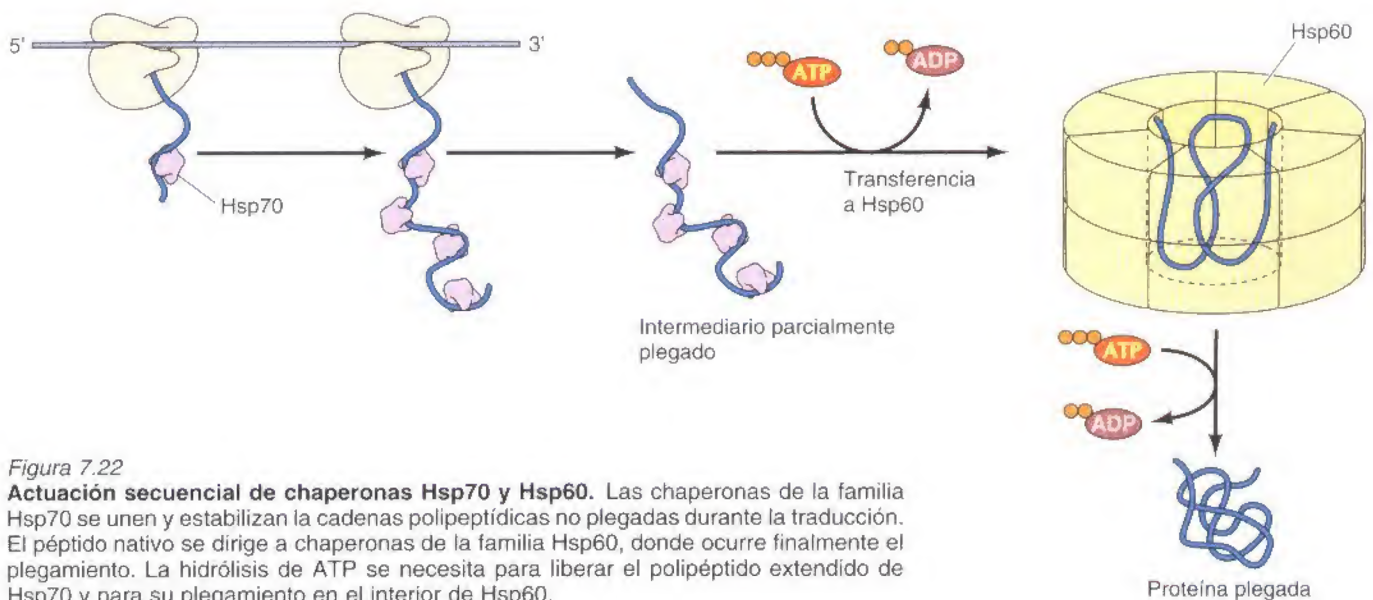



*Figura 7.22*
**Actuación secuencial de chaperonas Hsp70 y Hsp60.** Las chaperonas de la familia Hsp70 se unen y estabilizan la cadenas polipeptídicas no plegadas durante la traducción. El péptido nativo se dirige a chaperonas de la familia Hsp60, donde ocurre finalmente el plegamiento. La hidrólisis de ATP se necesita para liberar el polipéptido extendido de Hsp70 y para su plegamiento en el interior de Hsp60.

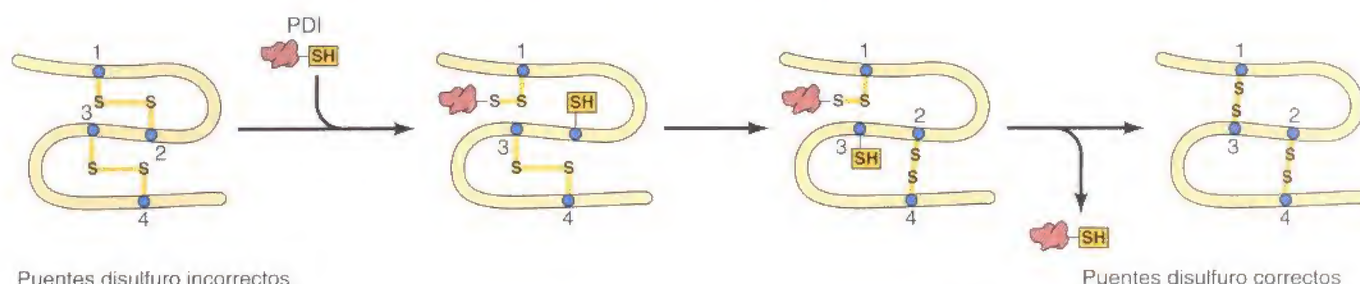



*Figura 7.23*
**Actividad de la proteína disulfuro isomerasa.** La proteína disulfuro isomerasa (PDI) cataliza la rotura de algunos puentes disulfuro y la formación de otros nuevos, lo que supone el intercambio entre parejas de puentes disulfuro en la cadena polipeptídica. La enzima cataliza la formación de un enlace disulfuro con un residuo de cisteína libre, e intercambia una cisteína de un puente ya formado por otra cisteína de la cadena polipeptídica. En el ejemplo, la PDI cataliza la conversión de dos puentes disulfuro incorrectos (1-2 y 3-4) en la forma correcta (1-3 y 2-4).

## *Enzimas y plegamiento de proteínas*

Además de la chaperonas, que facilitan el plegamiento de las proteínas mediante la unión y estabilización de intermediarios parcialmente plegados, las células también contienen al menos dos tipos de enzimas que catalizan el plegamiento de proteínas mediante la rotura y formación de nuevos enlaces covalentes. La formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína es importante en la estabilidad de la estructura plegada de muchas proteínas (véase Fig. 2.16). La **proteína disulfuro isomerasa** (PDI), descubierta por Christian Anfinsen en 1963, cataliza la rotura y formación de estos enlaces (Fig. 7.21). En las proteínas que contienen múltiples residuos del aminoácido cisteína, la PDI desempeña un papel importante promoviendo el intercambio rápido entre parejas de puentes disulfuro, para que la proteína adquiera el patrón de puentes disulfuro compatible con una conformación estable. Los puentes disulfuro son especialmente abundantes en proteínas secretadas y algunas proteínas de membrana, porque el citosol contiene agentes reductores que mantienen los residuos de cisteína en la forma reducida (- SH), impidiendo la formación del puente disulfuro (S - S). En células eucariotas, los puentes disulfuro se forman en el retículo endoplásmico, en cuyo lumen hay un ambiente oxidante. De acuerdo con el papel estabilizador de los puentes disulfuro en las proteínas que van a ser secretadas, la actividad de la enzima PDI en el retículo endoplásmico se relaciona con el nivel de secreción de proteínas en los diferentes tipos celulares.

La segunda enzima con un papel importante en el plegamiento de proteínas cataliza la isomerización de los enlaces peptídicos donde participa el aminoácido prolina (Fig. 7.22). La prolina es un aminoácido especial en el que el equilibrio entre las conformaciones *cis* y *trans* del enlace peptídico que precede a un residuo de prolina, está ligeramente desplazado hacia la conformación *trans*. Por el contrario los enlaces peptídicos formados entre otros aminoácidos se encuentran casi siempre en una conformación *trans*. La isomerización entre las configuraciones *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina, que podría representar un paso limitante del plegamiento de proteínas, la cataliza la enzima **peptidil prolil isomerasa**. Esta enzima está ampliamente distribuida tanto en células procariotas como eucariotas y cataliza el plegamiento de varias proteínas.

## *Escisión de proteínas*

La escisión de las cadenas polipeptídicas (**proteólisis**) es una etapa importante en la maduración de muchas proteínas. Un ejemplo sencillo es la eliminación de la metionina inicial del extremo amino terminal de muchos polipéptidos, proceso que ocurre al principio de la traducción, antes de que la cadena polipeptídica se sintetice completamente. La adición de nuevos grupos químicos al residuo amino terminal del polipéptido, por ejemplo grupos acetilo o cadenas de ácidos grasos, ocurre con frecuencia.

Las modificaciones proteolíticas de los extremos amino también tienen un papel fundamental en la translocación de muchas proteínas a través de la mem-




*Figura 7.24*
**Actividad de la peptidil prolil isomerasa.** La peptidil prolil isomerasa cataliza la isomerización entre la conformación *cis* y *trans* de los enlaces peptídicos en los que interviene la prolina.

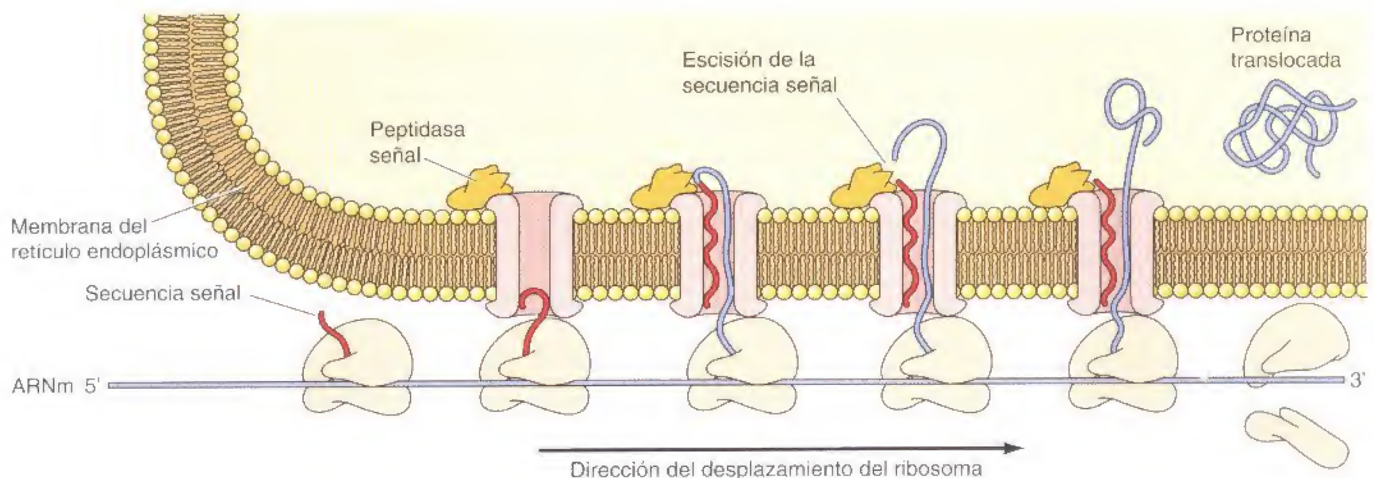



*Figura 7.25*

**Papel de las secuencias señal en la translocación a través de la membrana.** Las secuencias señal dirigen la translocación de las cadenas polipeptídicas a través de la membrana plasmática de bacterias o hacia el interior del retículo endoplásmico en las células eucariotas (véase dibujo). Esta secuencia señal, una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica se inserta en un canal de la membrana inmediatamente tras su síntesis en el ribosoma. El resto de la proteína es translocada a través del canal y la secuencia señal es eliminada por la actividad de una peptidasa señal, liberándose una proteína madura y translocada.

branas celulares, incluyendo la secreción de proteínas tanto en células bacterianas como eucariotas, así como las proteínas que van a formar parte de la estructura de la membrana plasmática, lisosomas, mitocondrias y cloroplastos en células eucariotas. Estas proteínas son marcadas con secuencias amino terminales para transportarse a sus destinos finales, y estas secuencias son eliminadas de la cadena polipeptídica por escisión proteolítica cuando atraviesan las membranas. Por ejemplo, la **secuencia señal** amino terminal, formada aproximadamente por 20 aminoácidos, marca las proteínas que se dirigen a la membrana plasmática en bacterias, o al retículo endoplásmico en células eucariotas, mientras ocurre la traducción (Fig. 7.25). La secuencia señal, formada predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos, se inserta en la membrana cuando emerge del ribosoma. El resto de la cadena polipeptídica pasa a través de un canal de la membrana a medida que es sintetizada. Esta secuencia señal posteriormente es escindida por una proteasa de membrana específica (**peptidasa señal**), liberándose la proteína madura. En células eucariotas, la translocación al retículo endoplásmico de cadenas polipeptídicas nacientes es el primer nivel en el marcaje de proteínas que se destinarán a la secreción, a formar parte de la membrana plasmática o se incorporarán a los lisosomas. Los mecanismos que dirigen el transporte de proteínas a sus destinos, así como el papel de otras secuencias señal que dirigen las proteínas al interior de las mitocondrias y cloroplastos, se discutirán en los Capítulos 9 y 10.

Otro ejemplo importante de procesamiento proteolítico es la formación de enzimas u hormonas funcionalmente activas, mediante escisión de precursores inactivos de mayor tamaño. La insulina se sintetiza como un precursor polipeptídico más grande y representa un ejemplo clásico. La insulina se forma a partir de dos escisiones. El precursor inicial (preproinsulina) contiene una secuencia señal amino terminal que dirige la cadena polipeptídica hacia el retículo endoplásmico (Fig. 7.26). La eliminación de la secuencia señal durante la translocación al retículo endoplásmico produce un segundo precursor, llamado proinsulina. Este precursor se transforma finalmente en insulina, formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, previa escisión proteolítica de un péptido interno. Otras proteínas activadas mediante mecanismos de escisión similares son las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea.

Es interesante reseñar que las proteínas de muchos virus animales derivan de la escisión de largos precursores polipeptídicos. Un ejemplo particularmente importante del papel de la proteolisis en la replicación vírica lo proporciona el VIH. En la replicación del VIH, una proteasa codificada por el virus escinde polipéptidos precursores para formar proteínas víricas estructurales. Debido a

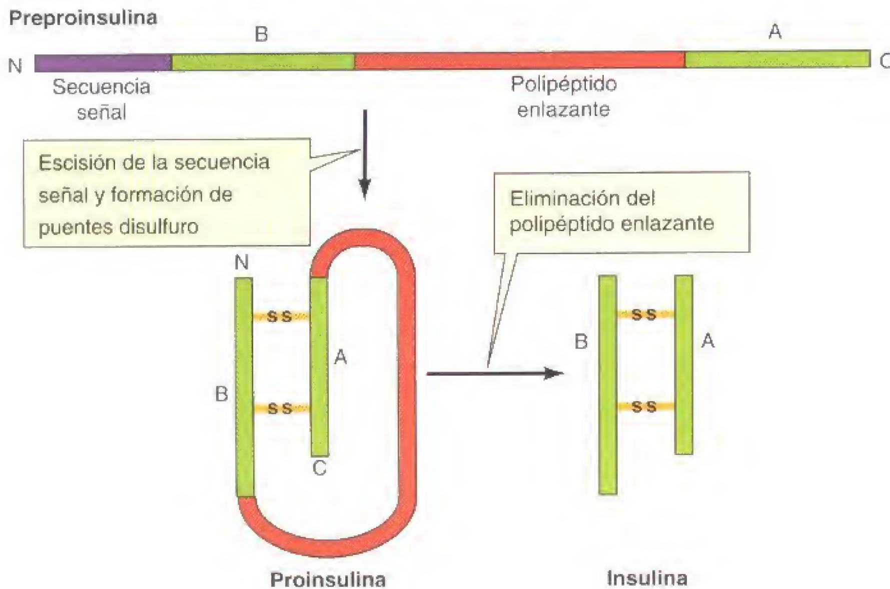



*Figura 7.26*
**Procesamiento proteolítico de la insulina.** La molécula activa de insulina consta de dos subunidades polipeptídicas (A y B) unidas por puentes disulfuro. Es sintetizada como un polipéptido precursor (preproinsulina) que contiene una secuencia señal amino terminal que se eliminará durante la transferencia de la cadena polipeptídica al retículo endoplásmico. Esta escisión origina un segundo precursor (proinsulina), que es transformado en insulina por un mecanismo de proteólisis mediante el que se elimina un fragmento interno del polipéptido.

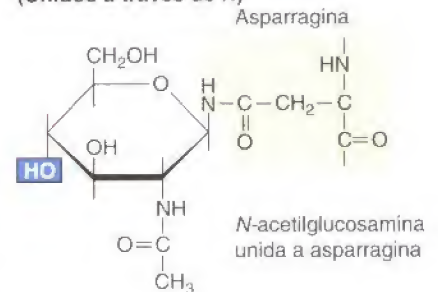
su papel central en la replicación vírica, la proteasa del VIH (además de la transcriptasa inversa) es una importante diana para el desarrollo de drogas usadas para el tratamiento del SIDA. En efecto, los inhibidores de la proteasa son en la actualidad los fármacos más efectivos que se utilizan para combatir la enfermedad.

## *Glicosilación*

Muchas proteínas, particularmente en células eucariotas, son modificadas por la adición de carbohidratos en un proceso conocido como **glicosilación**. Las proteínas a las que se les ha añadido una cadena de glúcidos (llamadas **glicoproteínas**) normalmente son secretadas o se localizan en la superficie celular, aunque algunas proteínas nucleares o citosólicas también están glicosiladas. Los carbohidratos de las glicoproteínas tienen funciones importantes en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, en la decisión del destino de las proteínas a su compartimento intracelular, y como sitio de reconocimiento en las interacciones célula-célula.

Las glicoproteínas se clasifican en dos tipos: *N*-glicoproteínas y *O*-glicoproteínas, dependiendo del sitio de unión de la cadena de carbohidratos (Fig. 7.25). En las *N*-glicoproteínas, los carbohidratos se unen al átomo de nitrógeno de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En las *O*-glicoproteínas, el átomo de oxígeno de los aminoácidos serina o treonina es el sitio de unión de la cadena glucídica. Los azúcares que se unen directamente a estos sitios son normalmente *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina respectivamente.

La mayoría de la glicoproteínas de las células eucariotas será destinada a la secreción o a formar parte de la membrana plasmática. Estas proteínas se transfieren normalmente al interior del retículo endoplásmico (previa escisión de la secuencia señal) mientras la proteína es sintetizada. La glicosilación se inicia también en el retículo endoplásmico antes de que termine la traducción de



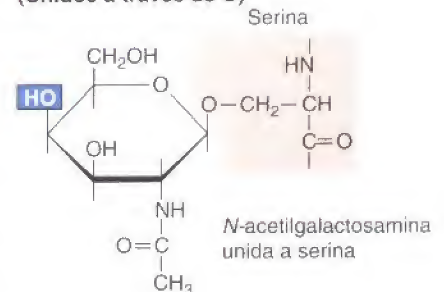




*Figura 7.27*
**Anclaje de carbohidratos para formar glicoproteínas.** Las cadenas de azúcares de las *N*-glicoproteínas están unidas a un residuo de asparragina, mientras que los de las *O*-glicoproteínas se unen a serina (véase dibujo) o a treonina. Los azúcares unidos a los aminoácidos son, normalmente, *N*-acetilglucosamina (unidos a través de *N*) o *N*-acetilgalactosamina (unidos a través de *O*).

la proteína. El proceso comienza con la transferencia de un oligosacárido común compuesto por 14 residuos de monosacárido (2 *N*-acetilglucosaminas, 3 glucosas y 9 manosas) a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica en crecimiento (Fig. 7.28). El oligosacárido se localiza en la membrana del retículo endoplásmico unido a un lípido transportador (**dolicol fosfato**). Este oligosacárido es transferido como una unidad completa a un residuo de asparragina (Asn) aceptora, que forma parte de la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido distinto de prolina).

Este oligosacárido inicial, una vez unido a la proteína, sufrirá modificaciones posteriores. Tres residuos de glucosa y uno de manosa son eliminados mientras la proteína se encuentra en el retículo endoplásmico. Posteriormente las glicoproteínas pasarán al aparato de Golgi donde sufrirán modificaciones adicionales. Estas modificaciones se explicarán en el Cap. 9 e incluyen tanto la eliminación como la adición de distintos residuos de monosacáridos a medida que la glicoproteína es transportada por los distintos compartimentos del Golgi (Fig. 7.29). Los *N*-oligosacáridos de diferentes glicoproteínas son procesados de distinta manera dependiendo de las enzimas presentes en los distintos tipos celulares y de la accesibilidad del oligosacárido a las enzimas que catalizan su modificación. A las glicoproteínas con oligosacáridos inaccesibles no se les añade nuevos monosacáridos en el Golgi. Los oligosacáridos relativamente simples de estas glicoproteínas se llaman oligosacáridos ricos en manosa debido a la alta proporción de residuos de manosa y tienen una composición similar al oligosacárido inicial que se añadió en el retículo endoplásmico. Por el contrario, las glicoproteínas cuyos oligosacáridos son más accesibles a las enzimas son modificadas en mayor grado, originando una gran variedad de oligosacáridos complejos.

Los *O*-oligosacáridos se añaden a las proteínas en el aparato de Golgi. A diferencia de los ligados a *N*, los *O*-oligosacáridos se forman por la adición de un único azúcar compuesto por pocos residuos de monosacárido (Fig. 7.30).

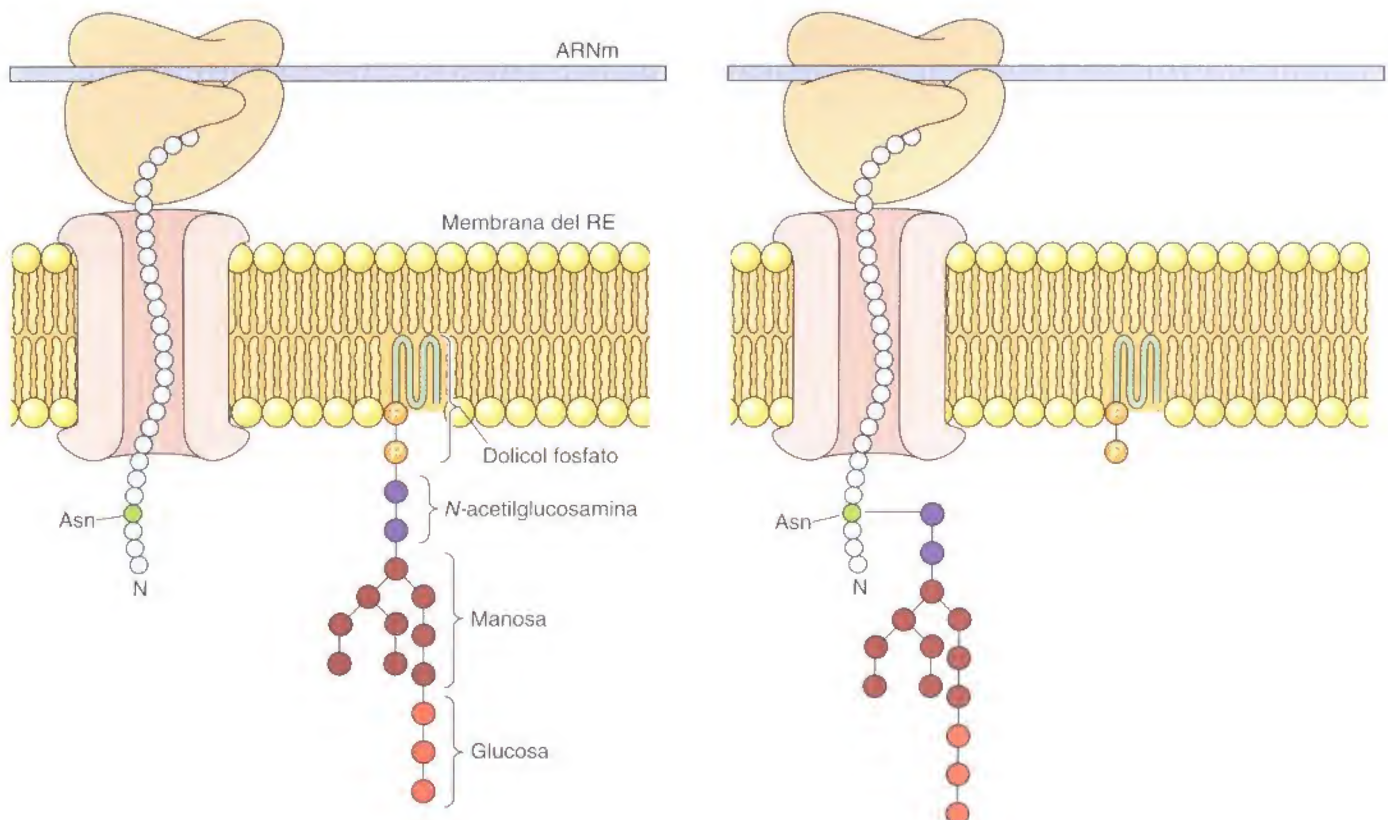



*Figura 7.28*
**Síntesis de *N*-glicoproteínas.** La primera etapa de la glicosilación es la adición, en el retículo endoplásmico (RE), de un oligosacárido formado por 14 residuos de monosacáridos a la cadena polipeptídica en crecimiento. El oligosacárido (formado por dos *N*-acetilglucosaminas, nueve manosas y tres glucosas) se une a un lípido (dolicol fosfato) en la membrana del retículo endoplásmico. El oligosacárido es transferido desde el dolicol fosfato a un residuo de asparragina de la cadena polipeptídica.

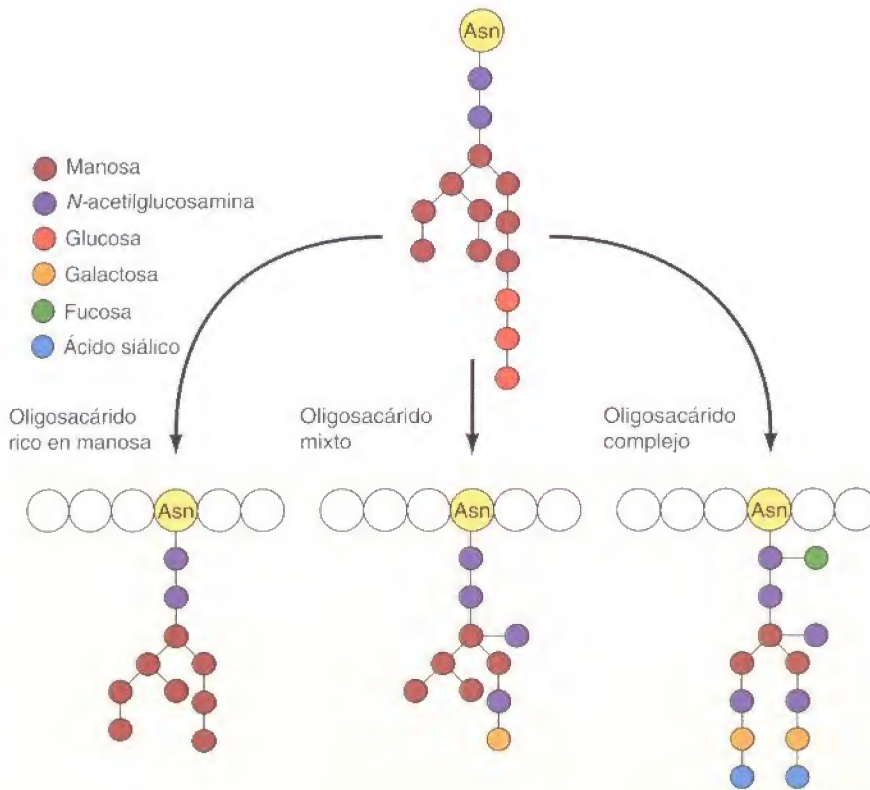



*Figura 7.29*
**Ejemplos de *N*-oligosacáridos.** Varios oligosacáridos proceden de modificaciones del oligosacárido inicial con 14 azúcares incorporado a la proteína en el retículo endoplásmico (véase Fig. 7.28). En los oligosacáridos ricos en manosa, los residuos de glucosa y algunos residuos de manosa son eliminados, pero no se añade ningún azúcar. En la síntesis de oligosacáridos complejos, algunos residuos de manosa son eliminados, pero se añaden diversos monosacáridos. Los oligosacáridos híbridos o mixtos son intermedios entre los oligosacáridos ricos en manosa y los complejos. Las estructuras del dibujo son ejemplos representativos.

Muchas proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo una gran variedad de factores de transcripción, también se modifican por la adición de residuos únicos de *N*-acetilglucosamina formando *O*-glicoproteínas, proceso catalizado por un sistema enzimático diferente. Sin embargo, la función de los carbohidratos de estas glicoproteínas nucleares y citosólicas aún no se conoce.

## Anclaje de lípidos

Algunas proteínas en las células eucariotas se modifican mediante el anclaje de moléculas lipídicas a la cadena polipeptídica. Estas modificaciones con frecuencia marcan y anclan estas proteínas a la membrana plasmática, siendo el lípido por su naturaleza hidrofóbica el que se inserta en la membrana (véase Fig. 2.48). En las proteínas ancladas a la cara citosólica de la membrana de las células eucariotas son comunes tres tipos de modificaciones por adición de lípidos —*N*-miristoilación, prenilación y palmitoilación—. Un cuarto tipo de modificación, la adición de glicolípidos, tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara extracelular de la membrana plasmática.

En algunas proteínas, un ácido graso se une al extremo amino terminal de la cadena en crecimiento durante la traducción. En este proceso, llamado ***N*-miristoilación**, el ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) se une a un residuo N-terminal de glicina (Fig. 7.31). La glicina es con frecuencia el segundo aminoácido incorporado a la cadena polipeptídica durante la traducción; el residuo iniciador de metionina es eliminado por proteólisis antes de la adición del ácido graso. Muchas proteínas que son modificadas por *N*-miristoilación están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática; el papel del ácido graso en esta asociación se conoce a partir de experimentos que utilizan proteínas mutadas en las que la glicina N-terminal es sustituida por alanina. Esta sustitución impide la unión del ácido mirístico y bloquea la función de la proteína mutada impidiendo su anclaje a la membrana.

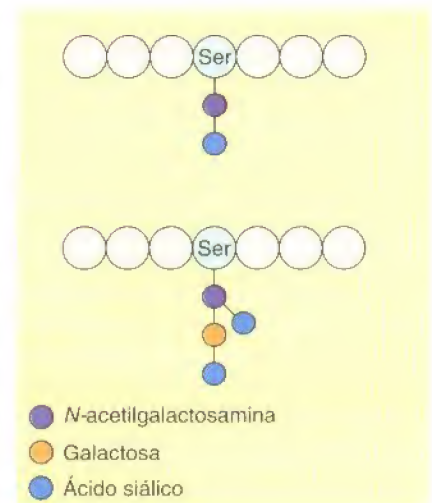



*Figura 7.30*
**Ejemplos de *O*-oligosacáridos.** Los oligosacáridos ligados a *O* normalmente están formados por pocos residuos de monosacárido, que se añaden uno a uno.

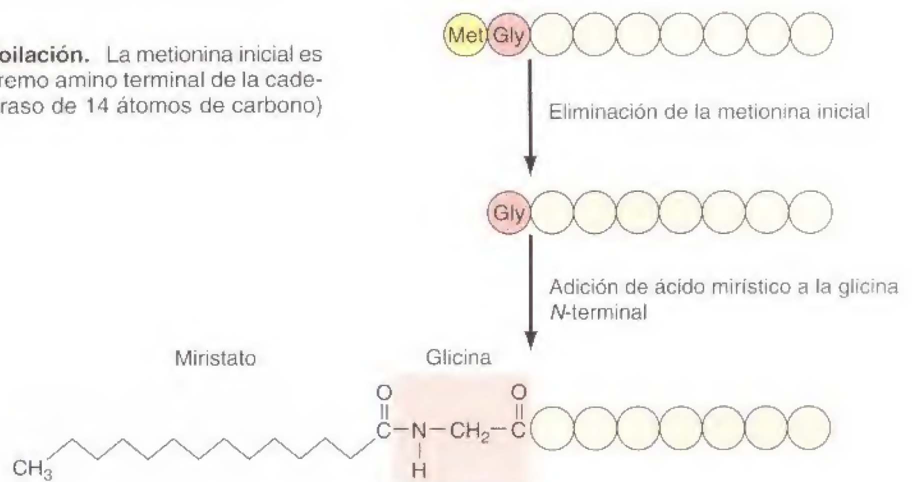



*Figura 7.31*
**Adición de un ácido graso mediante *N*-miristoilación.** La metionina inicial es eliminada, dejando la glicina siguiente en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. El ácido mirístico (un ácido graso de 14 átomos de carbono) es añadido posteriormente.

Los lípidos también se pueden anclar a las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, serina y treonina. Un ejemplo importante de este tipo de modificación es la **prenilación**, en la que un tipo específico de lípidos (grupos prenilo) se anclan a átomos de azufre de las cadenas laterales de los residuos de cisteína localizados cerca del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica (Fig. 7.32). Muchas proteínas asociadas a la membrana plasmática que participan en el control del crecimiento y diferenciación celulares son modificadas por esta vía, incluyendo la proteínas del oncogén *ras* , que son responsables del crecimiento celular incontrolado de muchos tumores humanos (véase Cap. 15). La prenilación de estas proteínas ocurre en tres etapas. Primero, el grupo prenilo se añade a una cisteína localizada a una distancia de tres aminoácios del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Los grupos prenilo añadidos en esta reacción pueden ser el farnesilo (15 carbonos, como se muestra en la Fig. 7.32) o geranilgeranilo (20 carbonos). Los aminoácidos siguientes a la cisteína modificada son eliminados, dejando la cisteína en el extre-

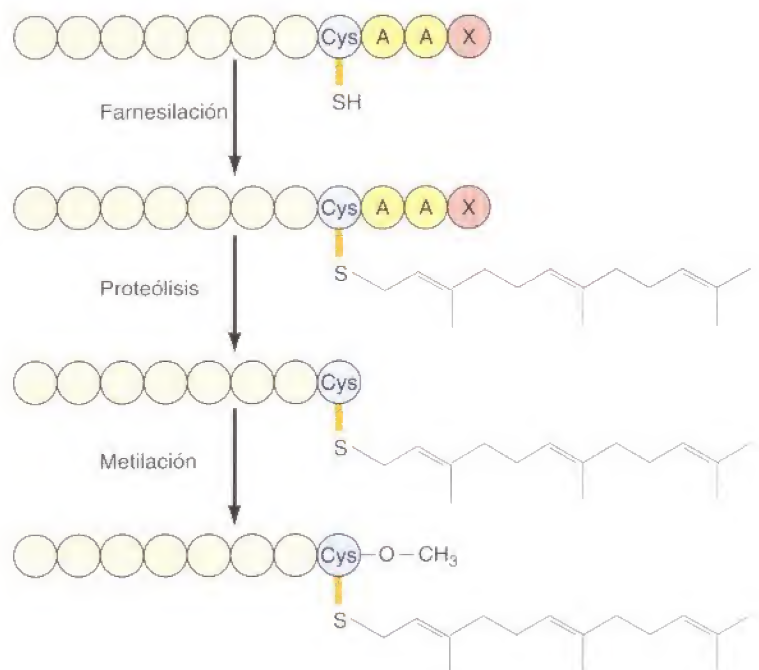



*Figura 7.32*
**Prenilación de una cisteína en el extremo carboxilo terminal.** El tipo de prenilación mostrada en el dibujo ocurre en proteínas codificadas por el oncogén *ras* y en proteínas de la envuelta nuclear (láminas nucleares). Estas proteínas terminan en un residuo de cisteína seguida de dos aminoácidos alifáticos (A) y otro aminoácido designado con la letra X, en el extremo carboxilo terminal. La primera etapa de la modificación es la adición de un grupo farnesilo, compuesto por 15 átomos de carbono, a la cadena lateral de la cisteína (farnesilación). En segundo lugar, ocurre la eliminación proteolítica de los tres aminoácidos que siguen a la cisteína, y, finalmente, la metilación de ésta que ahora se encuentra en el extremo carboxilo terminal.

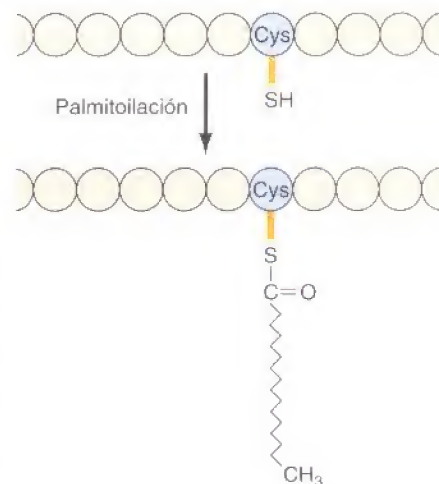



*Figura 7.33*
**Palmitoilación.** El palmitato (un ácido graso de 16 átomos de carbono) es añadido a la cadena lateral de un residuo interno de cisteína.

mo carboxilo terminal. Finalmente, un grupo metilo se añade al grupo carboxilo de la cisteína terminal.

El significado biológico del proceso de prenilación se ha descubierto mediante el uso de mutantes donde la falta de la cisteína en el extremo carboxilo terminal bloquea la asociación de la proteína a la membrana y por tanto la función de las proteína Ras. Debido a que la farnesilación es una modificación relativamente rara en las proteínas de la célula, el interés de este proceso radica en la posibilidad de poder usar fármacos como inhibidores de la enzima clave (farnesil transferasa) y poder aplicarlos en la terapia contra cánceres en los que están implicadas proteínas del oncogén *ras*. Estos inhibidores de la farnelisación se han usado para impedir el crecimiento de células tumorales en modelos experimentales y se ha demostrado su eficacia contra tumores humanos en diversos ensayos clínicos.

El tercer tipo de modificación por adición de ácidos grasos es la **palmitoilación**, en la que el ácido palmítico (un ácido graso de 16 átomos de carbono) se une a los átomos de azufre de la cadena lateral de residuos internos de cisteína (Fig. 7.33). Como la *N*-miristoilación y la prenilación, la palmitoilación tiene un papel importante en el anclaje de algunas proteínas a la cara citosólica de la membrana plasmática.

Finalmente, los lípidos unidos a oligosacáridos (**glicolípidos**) se añaden a los grupos carboxilo terminal de algunas proteínas, sirviendo como anclaje de estas proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática. Debido a que los glicolípidos unidos a estas proteínas contienen fosfatidilinositol, normalmente se llaman **«anclas» de glicosilfosfatidilinositol,** o **GPI**, (Fig. 7.34). Las porciones oligosacáridas del glicosilfosfatidilinositol se unen al grupo carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas. El grupo inositol del fosfatidilinositol se une a su vez al oligosacárido, por tanto el grupo carbohidrato actúa como puente entre la parte de proteínas y las cadenas de ácidos grasos del fosfolípido. El glicosilfosfatidilinositol se sintetiza y une a las proteínas como una unidad en el retículo endoplásmico. Esta adición se acompaña de la escisión de un péptido de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. La proteína modificada será transportada a la superficie celular, donde las cadenas de ácidos grasos del ancla de glicosilfosfatidilinositol median su union a la membrana plasmática.

## Regulación de la función de las proteínas

Una función importante de muchas proteínas es actuar como enzimas, necesarias para catalizar casi todas las reacciones biológicas. La regulación de la actividad enzimática tiene un papel clave en el comportamiento celular. Esto se logra, en parte, a nivel de la expresión génica, que determina la cantidad de una enzima (proteína) sintetizada en la célula. Un nivel posterior de regulación se consigue mediante el control de la función de las proteínas, lo cual permite a la

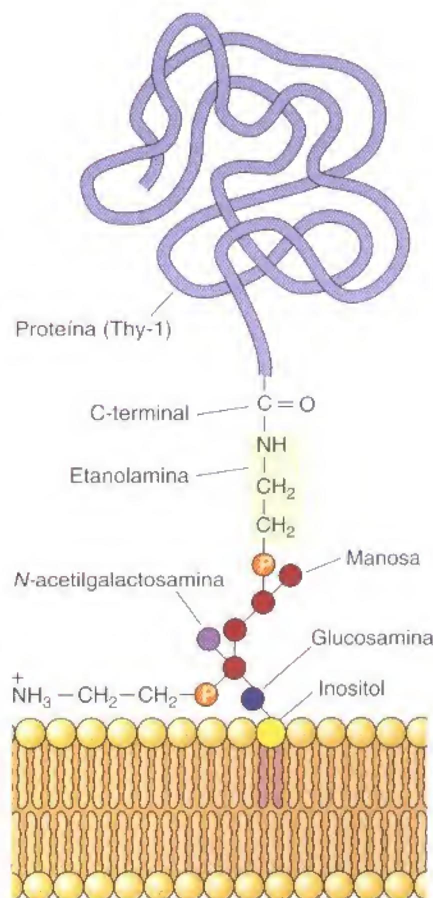



*Figura 7.34*
**Estructura de un ancla GPI.** El glicosilfosfatidilinositol, unido al carboxilo terminal, ancla la proteína a la membrana plasmática. Éste se une al aminoácido en el extremo carboxilo terminal a través de una etanolamina, que está unida a un oligosacárido formado por residuos de manosa, *N*-acetilgalactosamina y glucosamina. El oligosacárido se une a su vez al grupo inositol del fosfatidilinositol. Los dos ácidos grasos del fosfolípido se insertan dentro de la membrana plasmática. El glicosilfosfatidilinositol del dibujo pertenece a la proteína Thy-1 de una rata.

célula regular no sólo la cantidad sino también la función de sus proteínas. La regulación de las actividades de algunas proteínas implicadas en la transcripción y traducción ya se ha expuesto en éste capítulo y en el precedente, y muchos más ejemplos de regulación de la función de las proteínas en el control del comportamiento celular se expondrán a lo largo del desarrollo de este libro. En este apartado se discuten los tres mecanismos generales por los cuales se regulan las actividades de las proteínas celulares.

### Regulación por pequeñas moléculas

La mayoría de las enzimas son reguladas por cambios en su conformación que provocan modificaciones en su actividad catalítica. En muchos casos estos cambios de conformación se producen por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos o nucleótidos, que regulan la actividad enzimática. Este tipo de regulación es normalmente responsable del control de vías metabólicas en las que hay mecanismos de inhibición *feedback* (retroinhibición). Por ejemplo, los productos finales de muchas rutas enzimáticas (p. ej., aminoácidos) inhiben la enzima que cataliza la primera etapa de su síntesis; de esta manera se asegura una cantidad adecuada de producto y a su vez se evita su producción en exceso (Fig. 7.35). La retroinhibición es un ejemplo de **regulación alostérica** en la que una molécula reguladora se une a un sitio de la enzima distinto del centro activo (*alo* = otro; *estérico* = sitio). La unión de esta molécula reguladora modifica la conformación de la proteína, con lo cual se produce un cambio en su centro activo, afectando a la actividad enzimática (véase Fig. 2.29). Muchos factores de transcripción (vistos en el Capítulo 6) también están regulados por la unión de pequeñas moléculas. Por ejemplo, la unión de lactosa al represor *E. coli lac* induce un cambio conformacional que impide que el represor se adhiera al ADN. En las células eucarióticas, las hormonas esteroideas controlan de forma similar la expresión génica uniéndose a proteínas reguladoras de la transcripción.

La regulación de los factores de traducción como EF-Tu por la unión del GTP (véase Fig. 7.13) es un ejemplo de otro mecanismo común de regulación de la actividad de proteínas intracelulares. En este caso, la forma unida a GTP es la conformación activa, mientras que en la unida a GDP la proteína es inactiva. Muchas proteínas celulares también son reguladas por la unión a GTP o GDP. Un ejemplo son las proteínas codificadas por el oncogén *ras*, muy estudiadas por su papel en el control de la proliferación celular y en los cánceres humanos. Los análisis mediante cristalografía de rayos X de estas proteínas revelan diferencias conformacionales sutiles pero muy importantes entre la forma inactiva unida a GDP y la forma activa unida a GTP (Fig. 7.36). Estas pequeñas diferencias en la conformación de la proteína determinan que la proteína Ras (en la forma activa unida a GTP) pueda interaccionar con su molécula diana, e inducir la división celular. La importancia de estas diferencias en la conformación de la proteína se muestra en el hecho de que mutaciones en los genes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente el 15 % de los cánceres humanos. Estas mutaciones alteran la estructura de las proteínas Ras de tal manera que se mantienen indefinidamente en la conformación activa unida a GTP, actuando como una señal continua para la división celular, y de esta manera promueven un crecimiento incontrolado de las células tumorales. Por el contrario las proteínas Ras normales (no mutadas) alternan entre las conformaciones de unión a GTP y de unión a GDP, de tal forma que sólo son activas bajo la influencia de ciertas hormonas o de factores de crecimiento que se encargan de controlar la proliferación celular en los organismos pluricelulares.

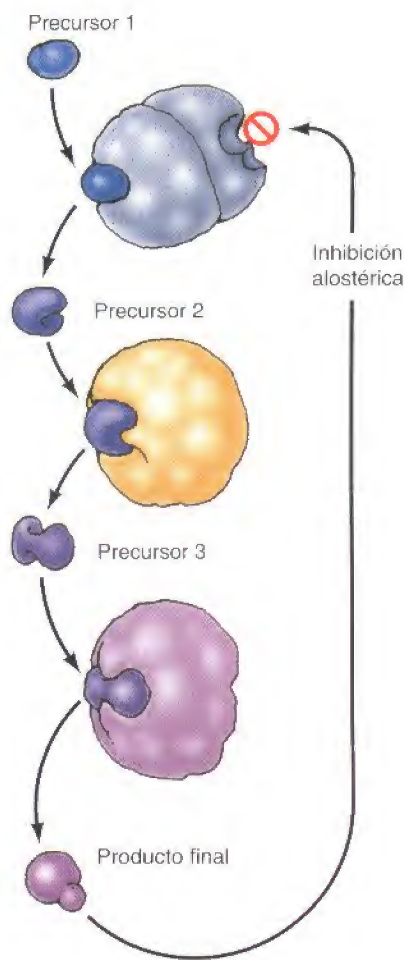



*Figura 7.35*
**Inhibición *feedback*.** El producto final de una ruta bioquímica actúa como un inhibidor alostérico de la enzima que cataliza la primera reacción de la ruta.

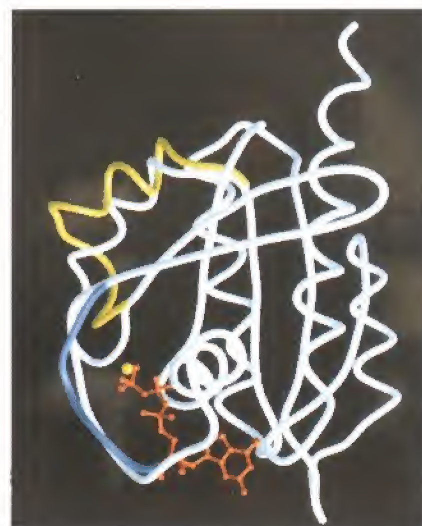


*Figura 7.36*
**Diferencias conformacionales entre proteínas Ras activas e inactivas.** Las proteínas Ras alternan entre una forma activa unida a GTP y una inactiva unida a GDP. El principal efecto de la unión a GTP frente a la unión a GDP es el cambio de conformación de dos regiones de la molécula, designadas regiones *switch* I y *switch* II. La parte de la proteína que forma complejo con GTP se representa en el dibujo en blanco, y la parte de unión al GDP de *switch* I y *switch* II se representan en azul y amarillo, respectivamente. El nucleótido de guanina se representa en rojo y el $Mg^{+2}$ en amarillo. (Cortesía de Sung-Hou Kim, Universidad de California, Berkeley.)

## *Fosforilación de proteínas*

Los ejemplos expuestos en la sección anterior implican uniones no covalentes de las proteínas con pequeñas moléculas inhibidoras o activadoras. Como no se forman enlaces covalentes, la unión de estas moléculas reguladoras a la proteína es reversible, permitiendo que la célula responda rápidamente a los cambios ambientales. Sin embargo, la actividad de muchas proteínas también se regula por modificaciones covalentes. Un ejemplo de este tipo de regulación es la activación de algunas enzimas por escisión proteolítica de precursores inactivos. Ya se ha mencionado previamente en este capítulo que las enzimas digestivas y las proteínas que participan en la coagulación sanguínea se regulan por este mecanismo. Sin embargo, puesto que la proteolisis es un proceso irreversible, es una vía de control de la actividad enzimática en vez de un mecanismo de activación y desactivación de las proteínas en respuesta a cambios ambientales. Por el contrario, otras modificaciones covalentes —en concreto la fosforilación— son procesos reversibles en el interior de la célula, y su función, al igual que la regulación alostérica, es activar o inhibir de manera reversible una gran variedad de proteínas celulares en respuesta a señales ambientales.

La fosforilación de proteínas está catalizada por enzimas **proteína quinasas o proteín quinasas**, la mayoría de las cuales transfieren un grupo fosfato desde el ATP a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina, treonina o tirosina (Fig. 7.37). Las proteínas quinasas son una de las familias de

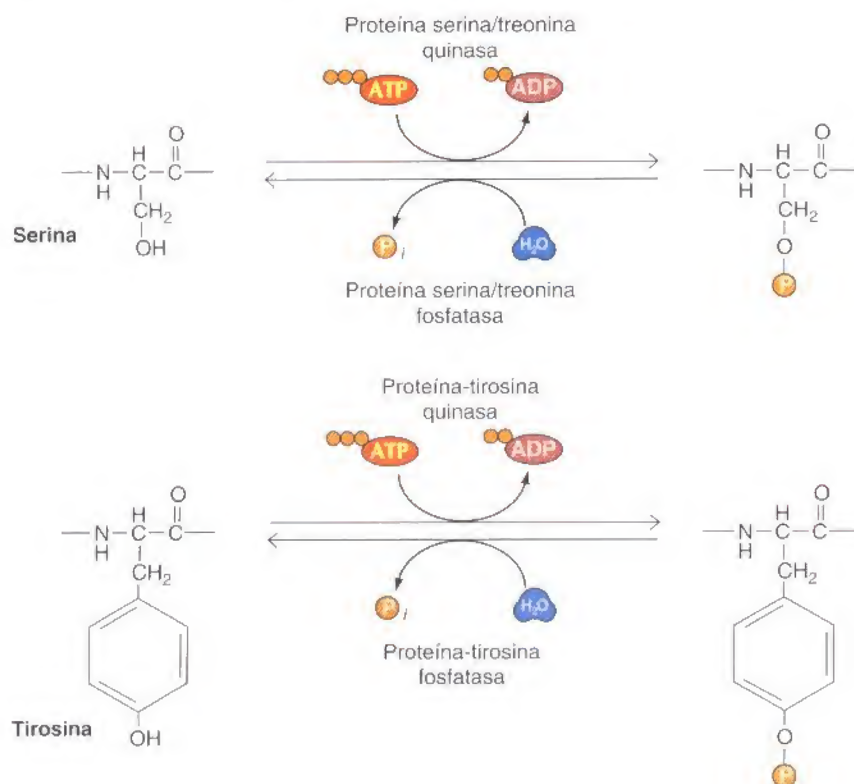



*Figura 7.37*
**Proteína quinasas y fosfatasas.** Las proteína quinasas catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la cadena lateral de la serina y treonina (proteína serina/treonina quinasas) o de la tirosina (proteína-tirosina quinasas). Las proteína fosfatasas catalizan la eliminación mediante hidrólisis de los grupos fosfato de estos mismos aminoácidos.

proteínas ms´s grandes en eucariotas, constituyendo aproximadamente el 2% de los genes eucariotas. La mayoría de las proteína quinasas fosforilan la serina y la treonina o la tirosina: estas enzimas se llaman **proteína-serina/treonina quinasas** o **proteína-tirosina quinasas**, respectivamente. La fosforilación de las proteínas se revierte por las enzimas **proteína fosfatasas o proteín fosfatasas**, que catalizan la hidrólisis de un grupo fosfato de un aminoácido fosforilado. Como las proteína quinasas, la mayoría de las proteína fosfatasas son específicas de serina y treonina o de tirosina, aunque algunas proteína fosfatasas reconocen cualquiera de los tres fosfoaminoácidos.

La acción combinada de la quinasas y las fosfatasas media la fosforilación reversible de muchas proteínas celulares. Con frecuencia las proteína quinasas participan en vías de transducción de señales en las que una quinasa fosforila una segunda quinasa que puede actuar a su vez sobre otra quinasa. La acción secuencial de varias proteína quinasas puede transmitir una señal recibida en la superficie celular a una proteína diana en el interior de la célula, cuyo efecto final son cambios en el comportamiento celular en respuesta a estímulos ambientales.

El modelo de la acción de las proteína quinasas proviene de los estudios realizados por Ed Fischer y Ed Krebs en 1955 sobre el metabolismo del glucógeno. En las células musculares la hormona epinefrina (adrenalina) provoca la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato, proporcionando energía para la contracción muscular. La glucogenólisis está catalizada por la glucógeno fosforilasa, que está regulada por una proteína quinasa (Fig. 7.38). La epinefrina se une a su receptor en la superficie de la célula desencadenando la conversión de ATP en AMP cíclico (AMPc), el cual se une y activa a una proteína quinasa, llamada proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta quinasa fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada fosforilasa quinasa. La fosforilasa quinasa fosforila y activa la enzima glucógeno fosforilasa que conduce a la producción de glucosa. Estas fosforilaciones encadenadas que activan a la fosforilasa quinasa primero y a la glucógeno fosforilasa después, pueden ser revertidas por enzimas fosfatasas específicas, de tal manera que la eliminación del estímulo inicial (epinefrina) inhibe la degradación del glucógeno.

La vía de señalización que provoca la activación de la glucógeno fosforilasa se inicia por la unión de pequeñas moléculas a la superficie celular —la epinefrina se une a su receptor y el AMPc se une a la proteína quinasa dependiente de AMPc—. La señal entonces se transmite a las dianas intracelulares mediante la acción secuencial de las proteína quinasas. Rutas similares, en las que participan enzimas quinasas y fosfatasas, están implicadas en la regulación de casi todos los aspectos del comportamiento en las células eucariotas (véanse Caps. 13 y 14). Las alteraciones de estas vías, relacionadas con alteraciones de las proteína quinasas, también son responsables de muchas enfermedades asociadas con una regulación inadecuada del crecimiento y diferenciación celular, en particular con el desarrollo del cáncer.

Pese a que la fosforilación es el tipo más frecuente y mejor estudiado de modificación covalente que regula la actividad proteica, otros tipos de modificaciones proteicas también juegan papeles importantes. Éstas incluyen la metilación y acetilación de residuos de lisina (vistos en el Capítulo 6), además de la adición de grupos NO a la cadena lateral de residuos de cisteína (nitrosilación).

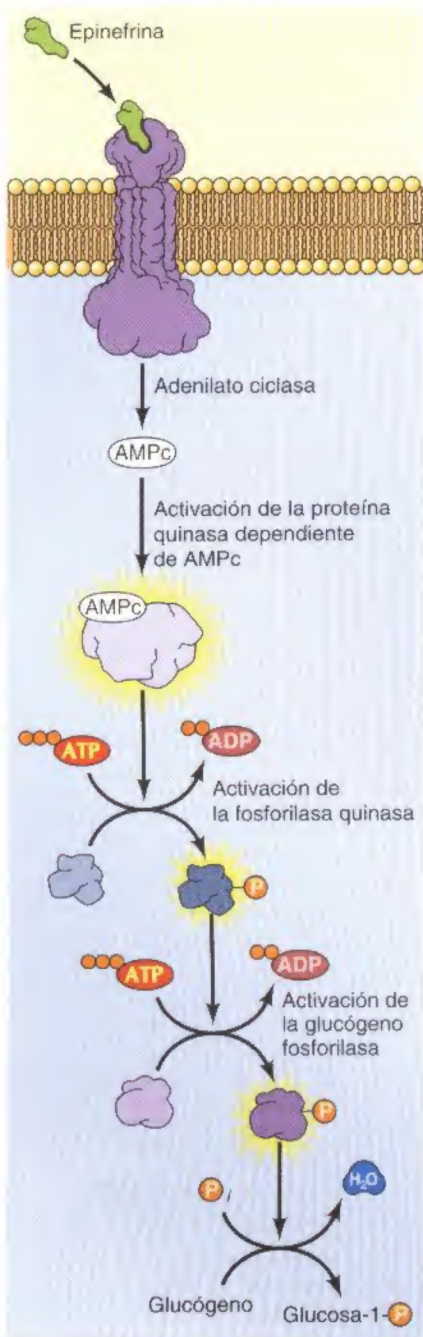



*Figura 7.38*
**Regulación de la degradación del glucógeno por fosforilación de las proteínas.** La unión de epinefrina (adrenalina) a receptores de la superficie celular provoca la producción de AMP cíclico (AMPc), que activa una proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta enzima fosforila y activa la fosforilasa quinasa que, a su vez, fosforila y activa la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa cataliza la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

Adicionalmente, se ha sugerido que la *O*-glicosilación de proteínas nucleares y citosólicas puede desempeñar un papel regulador.

### *Interacciones proteína-proteína*

Muchas proteínas están formadas por múltiples subunidades, cada una de las cuales es una cadena polipeptídica independiente. En algunas proteínas las subunidades son idénticas; en otras proteínas las subunidades son dos o más polipéptidos distintos. En cualquier caso la interacción entre los distintos polipéptidos es fundamental en la regulación de la actividad de la proteína. La importancia de estas interacciones es evidente en muchas enzimas alostéricas, como la aspartato transcarbamilasa, en la que la unión de una molécula reguladora altera la conformación de la proteína por cambios en las interacciones entre las subunidades.

Muchas enzimas también están reguladas por interacciones proteína-proteína. Un buen ejemplo es la proteína quinasa dependiente de AMPc, constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas (Fig. 7.39). En esta conformación la proteína está inactiva; las subunidades reguladoras inhiben la actividad enzimática de las subunidades catalíticas. La enzima se activa por la unión del AMPc, el cual se une a las subunidades reguladoras provocando un cambio conformacional que conduce a la disociación del complejo; las subunidades catalíticas libres son proteína quinasas enzimáticamente activas. Por tanto el AMPc actúa como un regulador alostérico alterando las interacciones proteína-proteína.

Las proteínas reguladoras de la transcripción, tratadas en el Cap. 6, proporcionan otro ejemplo importante de las interacciones proteína-proteína. Muchos factores de transcripción eucariotas funcionan como activadores o represores mediante interacciones proteína-proteína con otros componentes de la maquinaria responsable de la transcripción. Como se tratará en capítulos posteriores, interacciones proteína-proteína similares, que a su vez pueden ser reguladas por la unión de pequeñas moléculas y por procesos de fosforilación, desempeñan, un papel fundamental en el control de muchos aspectos diferentes del comportamiento celular.

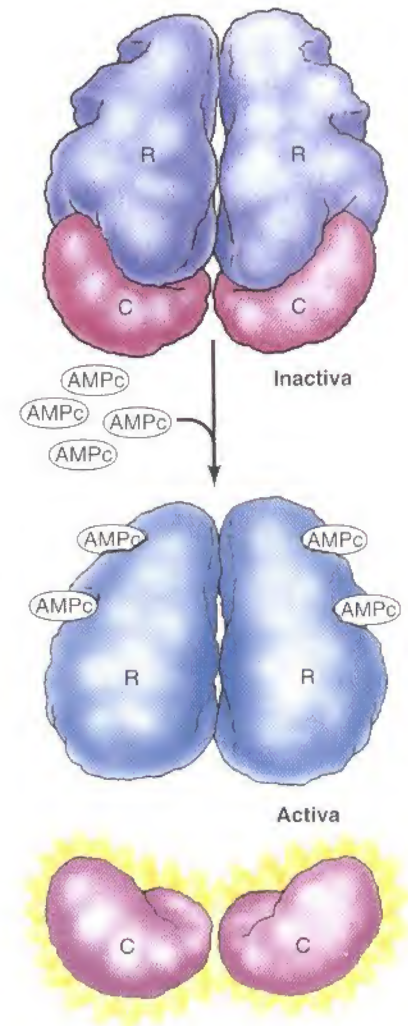



*Figura 7.39*
**Regulación de la proteína quinasa dependiente de AMPc.** En el estado inactivo, la enzima consta de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras e induce un cambio conformacional que provoca su disociación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas libres son enzimáticamente activas.

## Degradación de proteínas

La cantidad de proteínas en la célula está regulada no sólo por su tasa de síntesis sino también por su tasa de degradación. La vida media de las proteínas celulares es muy variable, desde pocos minutos a varios días, y las diferencias en la tasa de degradación de proteínas es un aspecto importante en la regulación celular. Muchas proteínas que son degradadas rápidamente actúan como moléculas reguladoras, como por ejemplo los factores de transcripción. El rápido reciclaje de estas proteínas es necesario para que sus niveles se ajusten rápidamente en respuesta a los estímulos externos. Otras proteínas se degradan en respuesta a señales específicas, siendo otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática intracelular. Además, las proteínas defectuosas o dañadas son reconocidas y rápidamente degradadas en el interior de la célula, por lo que se eliminan las consecuencias de los errores producidos durante la síntesis de proteínas. En células eucariotas son dos las rutas principales que se encargan de la degradación de proteínas: la vía de la ubiquitina-proteasoma y la proteólisis lisosómica.

### *Vía de la ubiquitina-proteasoma*

La ruta principal de la degradación selectiva de proteínas en células eucariotas usa la **ubiquitina** como un marcador de proteínas citosólicas y nucleares para una rápida proteolisis (Fig. 7.40). La ubiquitina es un polipéptido formado por 76 aminoácidos altamente conservado en las células eucariotas (levaduras, animales y plantas). Las proteínas quedan marcadas para su degradación median-

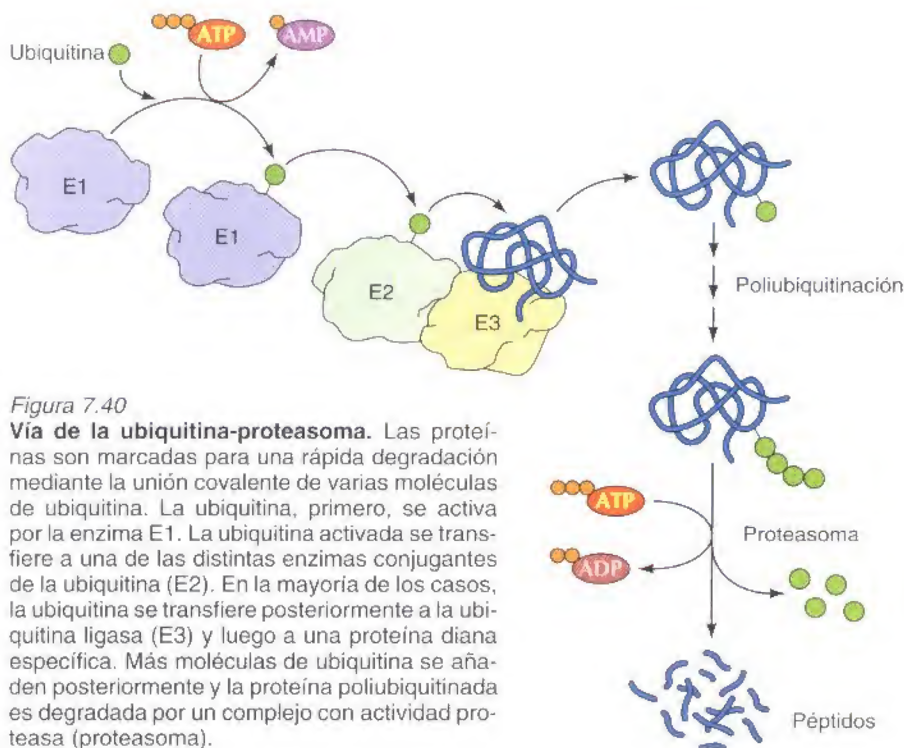



*Figura 7.40*
**Vía de la ubiquitina-proteasoma.** Las proteínas son marcadas para una rápida degradación mediante la unión covalente de varias moléculas de ubiquitina. La ubiquitina, primero, se activa por la enzima E1. La ubiquitina activada se transfiere a una de las distintas enzimas conjugantes de la ubiquitina (E2). En la mayoría de los casos, la ubiquitina se transfiere posteriormente a la ubiquitina ligasa (E3) y luego a una proteína diana específica. Más moléculas de ubiquitina se añaden posteriormente y la proteína poliubiquitinada es degradada por un complejo con actividad proteasa (proteasoma).

te la unión de la ubiquitina al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina. Moléculas de ubiquitina adicionales se añaden posteriormente para formar una cadena de varias ubiquitinas. Estas proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por un gran complejo con múltiples subunidades y con actividad proteasa llamado **proteasoma**. En este proceso la ubiquitina se libera, de tal manera que puede reutilizarse para otro ciclo de degradación de proteínas. Es de destacar que tanto la unión de la ubiquitina como la degradación de las proteínas marcadas requieren energía en forma de ATP.

Debido a que la unión de la ubiquitina marca las proteínas para una inmediata degradación, la estabilidad de muchas proteínas se determina por su capacidad para ubiquitinarse. La ubiquitinación es un proceso que ocurre en varias etapas. En primer lugar, la ubiquitina es activada por la unión a una enzima activadora de ubiquitina, E1. La ubiquitina posteriormente se transfiere a una segunda enzima denominada enzima conjugante de la ubiquitina (E2). Finalmente la ubiquitina se transfiere a una proteína diana a través de una tercera enzima llamada ubiquitina ligasa o E3, que es responsable del reconocimiento selectivo de los sustratos de proteínas adecuados. La mayoría de las células contienen un único tipo de enzima E1, pero tienen varios tipos de E2 y varias familias de enzimas E3. Distintos miembros de la familia de enzimas E3 reconocen distintos sustratos de proteínas, y es la especificidad de estas enzimas lo que marca selectivamente las proteínas celulares para la degradación por el complejo ubiquitina-proteasoma.

Un gran número de proteínas que controlan procesos celulares fundamentales, como la expresión génica y la proliferación celular, son dianas para los procesos de ubiquitinación y proteolisis. Un ejemplo interesante de esta degradación controlada lo proporcionan las proteínas (conocidas como ciclinas) que regulan la progresión a través del ciclo celular de las células eucariotas (Fig. 7.41). La entrada en mitosis de las células eucariotas está controlada en parte por la ciclina B, que es una subunidad reguladora de una proteína quinasa llamada Cdc2 (véase Cap. 14). La asociación de la ciclina B con la enzima Cdc2 es necesaria para la activación de la quinasa Cdc2, que inicia los procesos que ocurren en la mitosis (incluyendo la condensación de los cromosomas y el desensamblaje de la envoltura nuclear) mediante la fosforilación de varias proteínas celulares. La Cdc2 también activa un sistema de proteolisis mediada por ubiquitina que degrada la ciclina B cerca del final de la mitosis. La degradación de la ciclina B inactiva a Cdc2, permitiendo que la célula salga de la mitosis y entre en la interfase del siguiente ciclo celular. La ubiquitinación de la ciclina B es un proceso altamente selectivo, guiado por una secuencia de 9 aminoácidos en la ciclina B llamada caja de destrucción. Las mutaciones de esta secuencia impiden la proteolisis de la ciclina B, lo que provoca que la célula se detenga en la mitosis. De esta manera se demuestra la importancia de la degradación de proteínas en el control de los procesos de la división celular.

Pese a que la ubiquitinación generalmente dirige las proteínas hacia la degradación, la adición de ubiquitina a algunas proteínas puede cumplir otras fun-

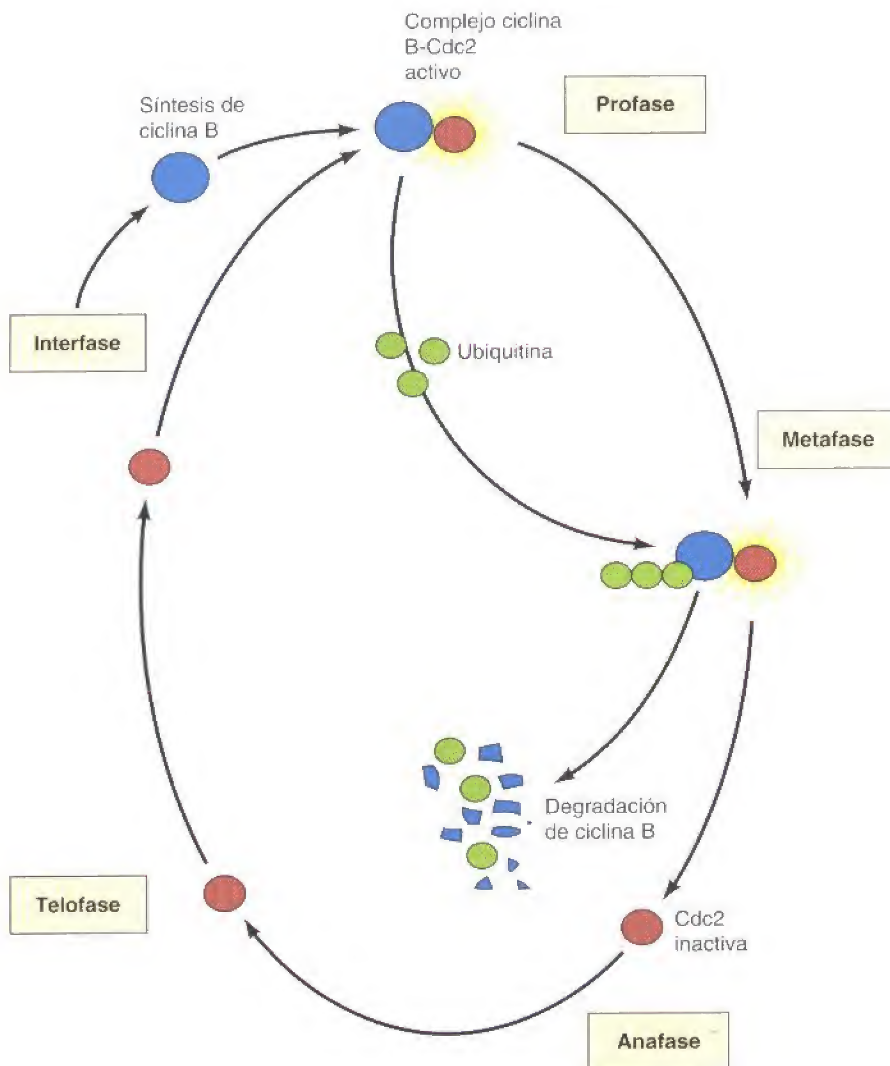



*Figura 7.41*
**Degradación de la ciclina durante el ciclo celular.** La progresión de las células eucariotas a través del ciclo celular es controlada en parte por la síntesis y degradación de la ciclina B, una subunidad reguladora de la proteína quinasa Cdc2. La síntesis de ciclina B durante la interfase lleva a la formación de un complejo activo ciclina B-Cdc2 que induce la entrada en mitosis. La degradación rápida de la ciclina B provoca la inactivación de la quinasa Cdc2, permitiendo que la célula salga de mitosis y entre en la interfase del siguiente ciclo celular.

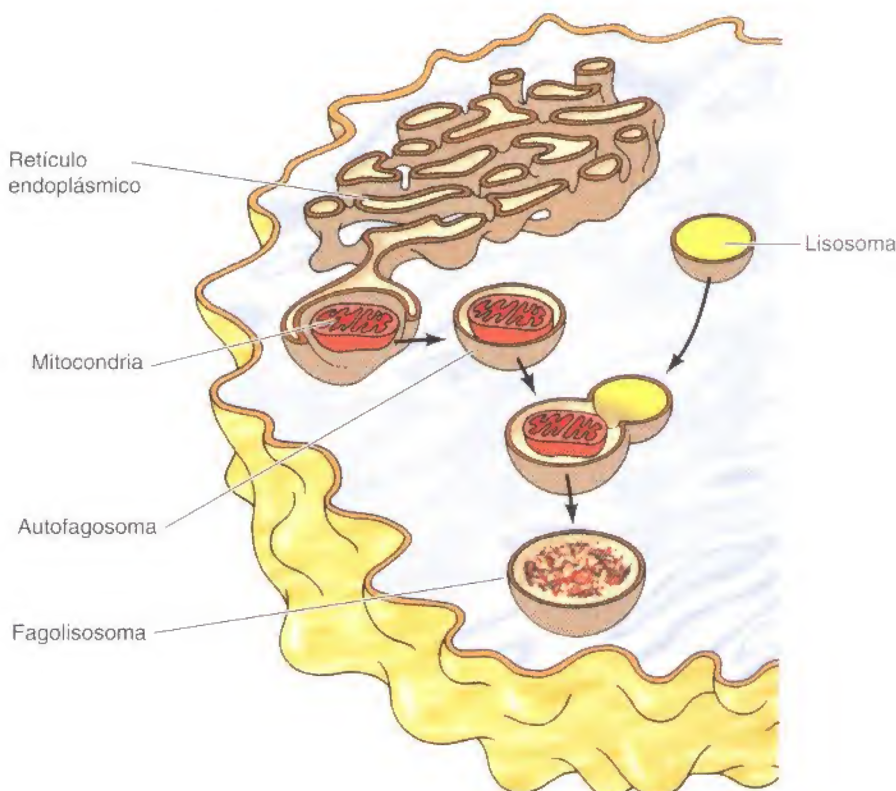
ciones. Por ejemplo, la ubiquitinación de ciertas proteínas sirve como marcador para la endocitosis, y la ubiquitinación de histonas puede constituir un elemento del «código de histonas» estudiado en el Capítulo 6. Adicionalmente, las proteínas pueden ser modificadas por la unión de otros polipéptidos relacionados con la ubiquitina como SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), que sirve para dirigir proteínas al núcleo y para la localización en dominios subnucleares (estudiado en el Capítulo 8).

## *Proteólisis lisosómica*

La otra ruta principal de degradación de proteínas en las células eucariotas supone la entrada de las proteínas a los **lisosomas**. Los lisosomas son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas digestivas, incluyendo distintos tipos de proteasas (véase Cap. 9). Los lisosomas tienen múltiples funciones en el metabolismo celular, incluyendo la digestión de proteínas extracelulares que entran en la célula por endocitosis, así como el reciclaje gradual de orgánulos citoplasmáticos y proteínas citosólicas.

El que las proteasas y otras enzimas digestivas estén contenidas en el interior de los lisosomas previene la destrucción incontrolada de los distintos componentes celulares. Por lo tanto, para que ocurra la proteólisis lisosómica, las proteínas de la célula primero deben entrar en los lisosomas. Un mecanismo de captura de las proteínas celulares, la **autofagia**, se produce mediante la forma-

*Figura 7.42*
**Sistema lisosómico.** Los lisosomas contienen varios tipos de enzimas digestivas, incluyendo proteasas. Los lisosomas capturan las proteínas mediante la fusión de éstos con vesículas autofagosómicas. Éstas se forman al quedar envueltas zonas del citoplasma o distintos orgánulos en vesículas membranosas originadas en el retículo endoplásmico. Esta fusión origina un fagolisosoma que digiere el contenido del autofagosoma.




ción de vesículas (autofagosomas) de tal manera que pequeñas áreas del citoplasma u orgánulos citoplasmáticos se rodean de membrana que procede del retículo endoplásmico (Fig. 7.42). Estas vesículas se fusionan con los lisosomas y las enzimas lisosómicas digestivas se encargan de digerir su contenido. La captura de proteínas en los autofagosomas parece ser un proceso no selectivo, con lo cual ocasiona una degradación de proteínas citosólicas de vida larga.

La autofagia está regulada en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y durante el desarrollo de los organismos multicelulares. La autofagia generalmente se activa bajo condiciones de ausencia de nutrientes, permitiendo a las células degradar proteínas no esenciales y orgánulos para que puedan reutilizarse sus componentes. Además, la autofagia juega un papel importante en diversos procesos del desarrollo, como la metamorfosis de insectos, que implica una amplia remodelación de los tejidos y degradación de componentes celulares.

| PALABRAS CLAVE | RESUMEN |
|---|---|
| | **TRADUCCIÓN DEL ARNm** |
| **ARNt, anticodón, aminoacil ARNt sintetasa** | ***ARNs de transferencia***: Los ARNs de transferencia sirven como adaptadores que alinean los aminoácidos en el molde de ARNm. Las aminoacil ARNt sintetasas unen los aminoácidos a los ARNt correspondientes, los cuales se unen a los codones del ARNm por complementariedad de bases. |
| **ribosoma, ARNr** | ***Ribosomas***: Los ribosomas están formados por dos subunidades, compuestas de proteínas y ARNs ribosómicos. El ARNr 23S es el principal catalizador de la formación del enlace peptídico. |

***Organización de los ARNm e iniciación de la traducción***: La traducción de los ARNm procariotas y eucariotas se inicia con un residuo de metionina. En bacterias, los codones de iniciación están precedidos por una secuencia que alinea el ARNm en los ribosomas con el ARN 16S por apareamiento de pares de bases. En eucariotas, los codones de iniciación se identifican por el rastreo a partir del extremo 5' del ARNm, que es identificado porque tiene una caperuza («cap») de 7-metil guanosina.

**región 5' no codificante, policistrónico, monocistrónico, región 3' no codificante secuencia Shine-Delgarno**

***Proceso de traducción***: La traducción se inicia por la unión del metionil ARNt y el ARNm a la subunidad ribosómica pequeña. La subunidad ribosómica grande se une al complejo y la cadena polipeptídica crece hasta que el ribosoma encuentra un codón de terminación en el ARNm. Varios factores no ribosómicos son necesarios para los procesos de iniciación, elongación y terminación tanto en las células procariotas como eucariotas.

**factor de iniciación, factor de elongación, factor de liberación, polisoma**

***Regulación de la traducción***: La traducción de los distintos ARNm puede ser regulada por la unión de proteínas represoras y proteínas que localizan los ARNm a regiones específicas de las células. La poliadenilación controlada del ARNm también es un mecanismo importante para la regulación de la traducción durante el desarrollo temprano. Adicionalmente, la traducción de algunos ARNm está controlada por ARNs no codificiantes que dirigen la degradación de ARNm homólogos mediante la interferencia de ARN. Finalmente la actividad traduccional general de las células puede ser regulada por la modificación de los factores de iniciación.

## PLEGAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS

***Chaperonas y plegamiento de proteínas***: Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento intracelular de las cadenas polipeptídicas en la conformación tridimensional apropiada mediante la unión a y la estabilización de cadenas polipeptídicas desplegadas o parcialmente plegadas.

**chaperona, proteína de choque térmico, chaperonina**

***Enzimas y plegamiento de proteínas***: Al menos dos tipos de enzimas, la proteína disulfuro isomerasa y la peptidil prolil isomerasa, catalizan el plegamiento de proteínas.

**proteína disulfuro isomerasa, preptidil prolil isomerasa**

***Escisión de proteínas***: La proteólisis es un mecanismo importante en el procesamiento de muchas proteínas. Por ejemplo, las proteínas secretadas y las proteínas incorporadas a la mayoría de los orgánulos son marcadas para dirigirse a sus destinos mediante secuencias amino terminales que son eliminadas por escisión de proteínas cuando las cadenas polipeptídicas pasan a través de la membrana.

**proteólisis, secuencia señal, peptidasa de señal**

***Glicosilación***: Muchas proteínas eucariotas, en particular las secretadas y las incorporadas a la membrana plasmática, son modificadas por la adición de carbohidratos en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi.

**glicosilación, glicoproteína, dolicol fosfato**

***Unión de lípidos***: Con frecuencia, la unión de lípidos por enlaces covalentes marca y ancla las proteínas a la membrana plasmática.

**N-miristoilación, prenilación, palmitoilación, glicolípido, glicosilfosfatidilinositol (GPI)**

## REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

***Regulación por pequeñas moléculas***: Muchas proteínas están reguladas por la unión de pequeñas moléculas, como aminoácidos y nucleótidos, que inducen cambios en la conformación y actividad de las proteínas.

**regulación alostérica**

***Fosforilación de proteínas***: La fosforilación reversible controla la actividad de una gran variedad de proteínas celulares, y es debida a la actividad de proteína quinasas y fosfatasas.

**proteína quinasa, proteína serina/treonina quinasa, proteína tirosina quinasa, proteína fosfatasa**

***Interacciones proteína-proteína***: Las interacciones entre las cadenas polipeptídicas son importantes en la regulación de las enzimas alostéricas y de otras proteínas celulares.

**DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS**

**ubiquitina, proteasoma**

***Ruta de la ubiquitina-proteasoma***: El principal mecanismo selectivo de degradación de proteínas en las células eucariotas utiliza la ubiquitina como un marcador que etiqueta las proteínas para una rápida proteólisis por el proteasoma.

**lisosoma, autofagia**

***Proteólisis lisosómica***: Las proteasas lisosómicas degradan las proteínas extracelulares captadas mediante endocitosis y son las responsables de la lenta degradación de orgánulos citoplasmáticos y de proteínas citosólicas de vida larga. Algunas proteínas son marcadas para su degradación selectiva en los lisosomas como respuesta a la falta de nutrientes.

## Preguntas

**1.** *E. coli* contiene 64 codones diferentes en sus ARNm, 61 de los cuales codifican aminoácidos. ¿Cómo pueden sintetizar proteínas si sólo poseen 40 ARNt diferentes?

**2.** ¿En qué dirección traduce un ribosoma a un ARNm, y en qué dirección es sintetizada la cadena polipeptídica?

**3.** Desea expresar un ADNc (ADN complementario) eurcariótico clonado en bacterias. ¿Qué tipo de secuencia debe añadir para que ese ARNm sea traducido por los ribosomas procariotas?

4. Discute las evidencias de que el ARN ribosómico es el principal componente catalítico del ribosoma.

**5.** En los óvulos fertilizados, ¿qué efecto se esperaría que tendría un inhibidor de la poliadenilación sobre la síntesis proteica?

**6.** ¿Qué son las chaperonas?

**7.** ¿Por qué resulta beneficiosa para la síntesis de proteinas de choque térmico su inducción por exposición de las células a temperaturas elevadas?

**8.** Durante el estudio de la auxina sodio fenilacetato de plantas, descubre ésta inhibe la síntesis de grupos farnesil. Puesto que ha cursado estudios generales de Biología Celular, reconoce inmediatamente sus implicaciones potenciales para potencialmente tratar el cáncer que implica a proteínas Ras anormalmente activas. ¿Cómo cree que el fenilacetato afectaría a la función de Ras, y por qué debería tener pocos efectos secundarios?

**9.** Usted está interesado en el estudio de una proteína expresada en la superficie de los hepatocitos. ¿Cómo podría determinar, tratando estás células con una fosfolipasa, si estas proteínas son transmembrana o si están unidas a la superficie celular mediante el GPI?

**10.** ¿Cuál es la evidencia de que la ubiquitinación y degradación de proteínas específicas por proteosomas requiere una secuencia diana específica en la proteína?

## Bibliografía

### *Traducción del ARNm*


Arnez, J. G. and D. Moras. 1997. Structural and functional considerations of the aminoacetylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* 22: 211-216. [R]

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920. [P]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548-555. [P]

Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545-556. [R]

Gray, N. K. and M. Wickens. 1998. Control of translation initiation in animals. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 399-458. [R]

Green, R. and H. F. Noller. 1997. Ribosomes and translation. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 679-716. [R]

Hellen, C. U. T. and P. Sarnow. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15: 1539-1612. [R]

Illangeskare, M., G. Sanchez, T. Nickles and M. Yarus. 1995. Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 267: 643-647. [P]

Kisselev, L. L. and R. H. Buckingham. 2000. Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25: 561-566. [R]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28. [R]

Kloc, M., N. R. Zearfoss and L. D. Etkin. 2002. Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108: 533-544. [R]

Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870. [R]

Moore, P. B. and T. A. Steitz. 2002. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418: 229-235. [R]

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930. [P]

Noller, H. F., V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416-1419. [P]

Nomura, M. 1997. Reflections on the days of ribosome reconstitution research. *Trends Biochem. Sci.* 22: 275-279. [R]

Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure

and the mechanism of translation. *Cell* 108: 557-572. [R]

Sachs, A. B., P. Sarnow and M. W. Hentze. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89: 831-838. [R]

Saks, M. E., J. R. Sampson and J. N. Abelson. 1994. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science* 263: 191-197. [R]

Wilson, K. S. and H. F. Noller. 1998. Molecular movement inside the translational engine. *Cell* 92: 337-349. [R]

Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartrsch and V. Ramakrishnan. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327-339. [P]

Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. NH. Earnest, J. H. D. Cate and H. F. Noller. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-896. [P]

Zamore, P. D. 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296: 1265-1269. [R]

## *Plegamiento y procesamiento de proteínas*

Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Bolsvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich and P. B. Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371: 578-586. [P]

Dalbey, R. E. and G. von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* 17: 474-478. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501-39504. [R]

Gahmberg, C. G. and M. Tolvanen. 1996. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 21: 308-311. [R]

Gething, M.-J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45. [R]

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858. [R]

Helenius, A. and A. Markus. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369. [R]

Hirschberg, C. B. and M. D. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63-87. [R]

Kornfield, R. and S. Kornfield. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 631-664. [R]

Schiene, C. and G. Fischer. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10: 40-45. [R]

Sigler, P. B., Z. Xu, H. S. Rye, S. G. Burston, W. A. Fenton and A. L. Horwich. 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 581-608. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563-591. [R]

Wells, L., K. Vosseller and G. W. Hart. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291: 2376-2378. [R]

Young, J. C., I. Moarefi and F. U. Hartl. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* 154: 267-273. [R]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

## *Regulación de la función de las proteínas*

Barford, D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine[threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 407-412. [R]

Fauman, E. B. and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 413-417. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase $\beta$ to $\alpha$ converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000: 297-301. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236. [R]

Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27: 514-520. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939-945. [P]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306-329. [P]

Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683. [R]

Taylor, S. S., D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. R. Eyck and J. M. Sowadski. 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 429-462. [R]

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294: 1299-1304. [R]

## *Degradación de proteínas*

Conaway, R. C., C. S. Brower and J. W. Conaway. 2002. Emerging roles of ubiquitin in transcriptional regulation. *Science* 296: 1254-1258. [R]

Coux, O., K. Tanaka and A. L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 801-847. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138. [P]

Hershko, A. and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 425-479. [R]

Jackson, P, K. 2001. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* 15: 3053-3058. [R]

Jackson, P. K., A. C. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J. Y. Hsu, B. K. Kaiser and J. D. R. Reimann. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10: 429-439. [R]

Klionsky, D. J. and S. D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721. [R]

Laney, J. D. and M. Hochstrasser. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97: 427-430. [R]

Pickart, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 503-533. [R]

*Sección* **III**

# *Estructura y función celulares*



# 8 Núcleo



LA EXISTENCIA DEL NÚCLEO ES LA CARACTERÍSTICA PRINCIPAL que diferencia las células eucariotas de las células procariotas. Por contener el genoma celular, el núcleo sirve de almacén de la información genética y como centro de control celular. La replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN ocurren en el interior del núcleo, y sólo la última etapa de la expresión génica (traducción) tiene lugar en el citoplasma.

Debido a que la envuelta nuclear separa el genoma del citoplasma, la expresión génica está regulada por mecanismos exclusivos de los organismos eucariotas. Mientras que los ARNm procariotas son traducidos a la que vez que ocurre la transcripción, los ARNm eucariotas sufren procesos postranscripcionales (p. ej., corte-empalme o *splicing*) antes de ser transportados desde el núcleo al citoplasma. La presencia de un núcleo, por tanto, permite que la expresión génica sea regulada por mecanismos postranscripcionales, como el *splicing* alternativo. Debido a que la envuelta nuclear limita el acceso de las proteínas al material genético, proporciona nuevas posibilidades para el control de la expresión génica a nivel de la transcripción. Por ejemplo, la expresión de algunos genes eucariotas se controla a través de la regulación del transporte de los factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo —un mecanismo de regulación transcripcional inexistente en procariotas—. Por lo tanto, la separación entre el genoma y el lugar de la traducción del ARNm desempeña un papel fundamental en la expresión génica en las células eucariotas.

## Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma

La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo del citoplasma y proporciona un armazón estructural al núcleo. Las membranas nucleares actúan como una barrera selectiva que impide el libre paso de las moléculas entre el interior nuclear y el citoplasma, manteniéndolos como dos compartimentos metabólicamente independientes. Los únicos canales en la envuelta nuclear están representados por los complejos de poro nucleares, que permiten un intercambio controlado de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. El tráfico selectivo de proteínas y ARNs a través de los complejos de poro nucleares no sólo mantiene la composición interna del núcleo sino que tiene un papel clave en la regulación de la expresión génica.

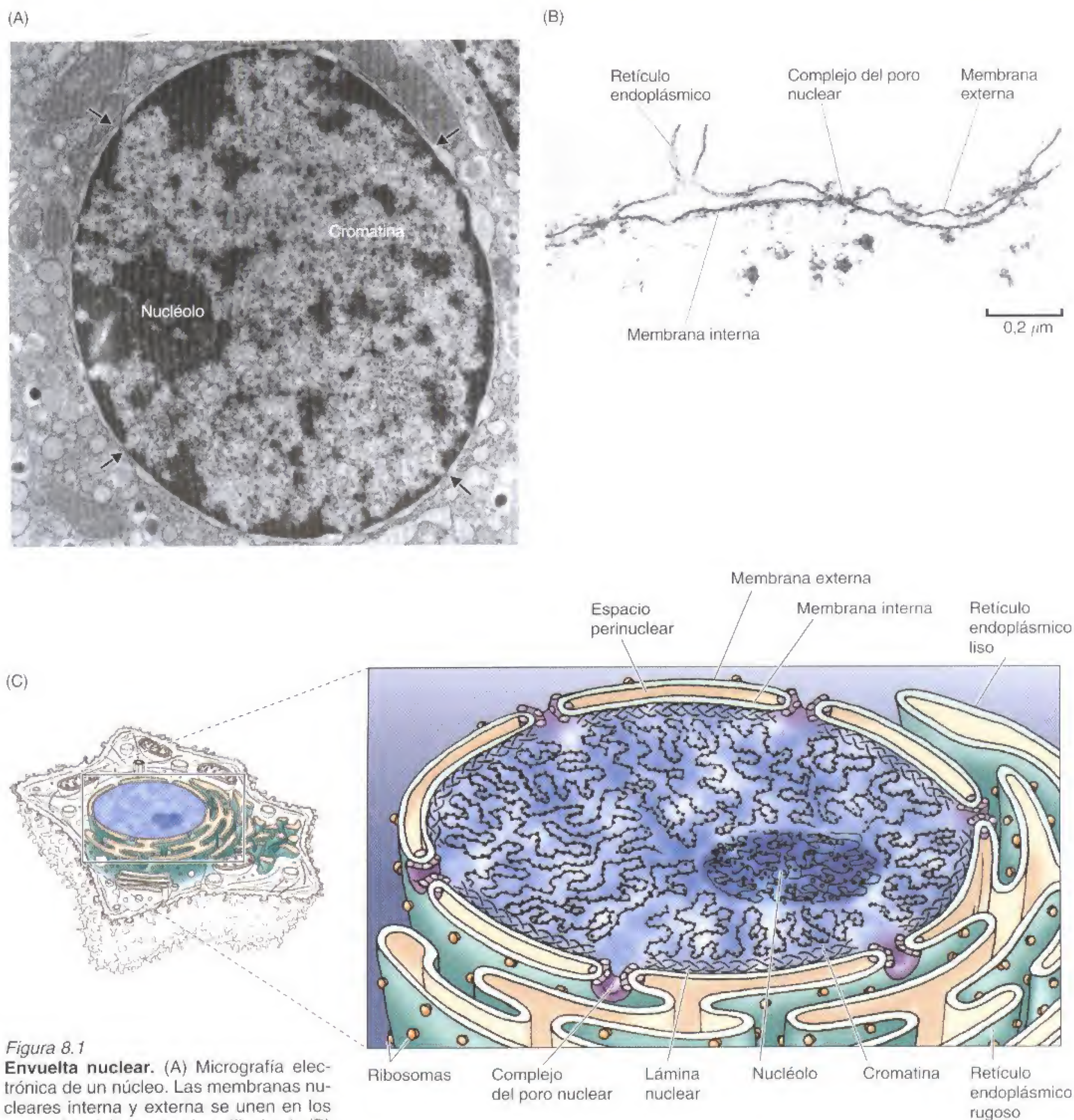



*Figura 8.1*
**Envuelta nuclear.** (A) Micrografía electrónica de un núcleo. Las membranas nucleares interna y externa se unen en los complejos del poro nuclear (flechas). (B) La micrografía electrónica muestra la continuidad de la membrana nuclear externa con el retículo endoplásmico. (C) Esquema de la envuelta nuclear. La membrana nuclear interna está en contacto con la lámina nuclear, que sirve de anclaje para la cromatina. (A, David M. Phillips/Photo Researchers, Inc; B, cortesía del Dr. Werner W. Franke, German Cancer Research Center, Heidelberg.)

## *Estructura de la envuelta nuclear*

La **envuelta nuclear** posee una estructura compleja, constituida por dos membranas nucleares, la lámina nuclear en su cara interna y por los complejos de poro nucleares (Fig. 8.1). El núcleo está delimitado por un sistema de dos membranas concéntricas, las **membranas nucleares** interna y externa. La membrana nuclear externa se continúa con la membrana del retículo endoplásmico, por lo que hay una comunicación directa entre el espacio intermembrana y el lumen del retículo endoplásmico. Además la membrana nuclear externa es funcional-

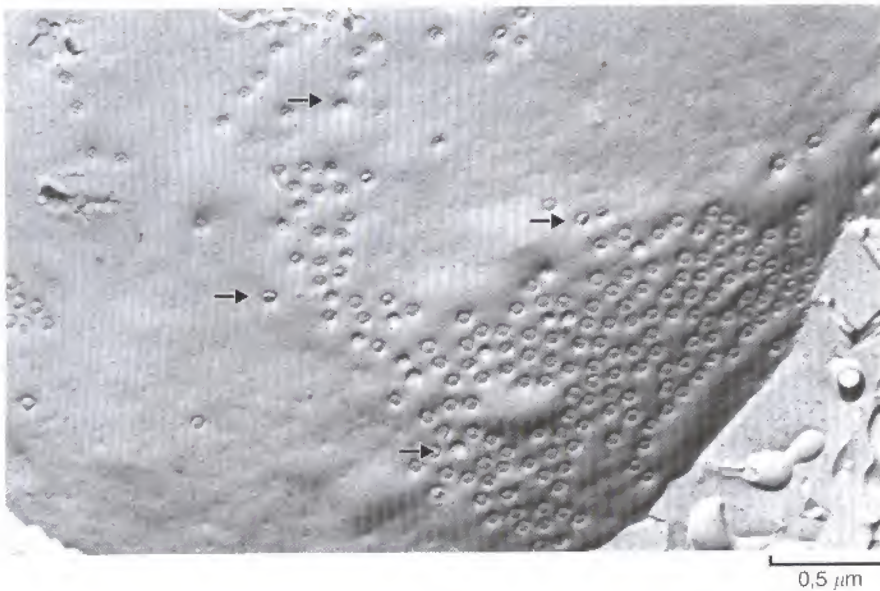



*Figura 8.2*
**Micrografía electrónica que muestra los poros nucleares.** Se observan muchos poros nucleares (flechas) en esta preparación por criofractura de la envuelta nuclear. (Photo Researchers, Inc.)

mente similar a la del retículo endoplásmico (véase Cap. 9) y también posee ribosomas adheridos a su superficie citoplasmática. Por el contrario, la membrana nuclear interna tiene proteínas únicas que son específicas para el núcleo, como aquellas que unen la matriz nuclear de láminas (estudiada más adelante).

La función principal de las membranas nucleares es actuar como una barrera que separa el contenido del interior nuclear del citoplasma. Como otras membranas celulares, la membrana nuclear es una bicapa fosfolipídica, permeable sólo a pequeñas moléculas apolares (véase Fig. 2.49). Otras moléculas son incapaces de difundir a través de esta bicapa fosfolipídica. Las membranas interna y externa se unen en los complejos de poro nuclear, siendo los únicos canales que permiten el paso de pequeñas moléculas polares y de macromoléculas a través de la envuelta nuclear (Fig. 8.2). Como se estudiará en la sección siguiente, el complejo del poro nuclear es una estructura compleja responsable del tráfico selectivo de proteínas y de ARNs entre el núcleo y el citoplasma.

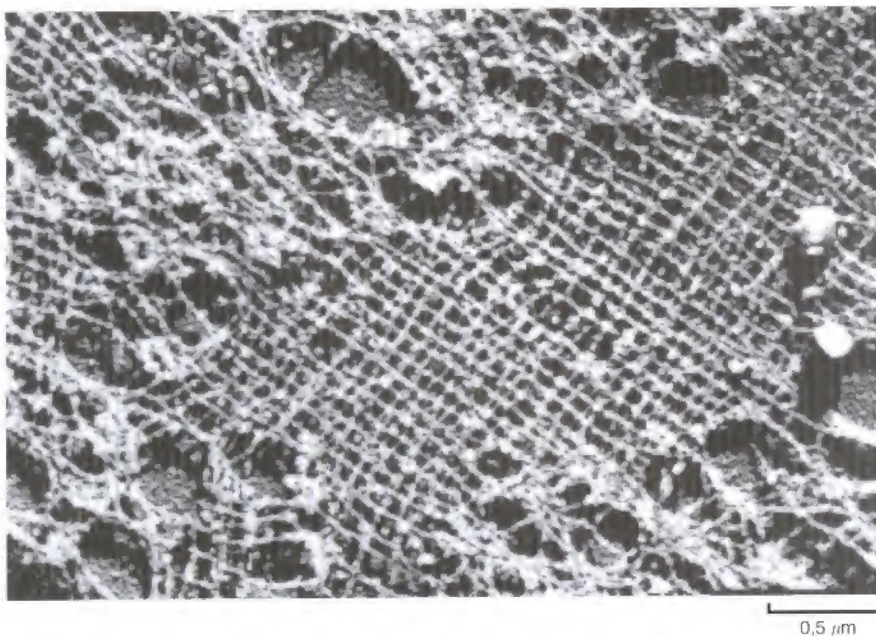



*Figura 8.3*
**Micrografía electrónica de la lámina nuclear.** La lámina es una red de filamentos por debajo de la membrana nuclear interna. (De U. Aebi, L. Cohn, L. Buhle y L. Gerace, 1986. *Nature* 323:560.)

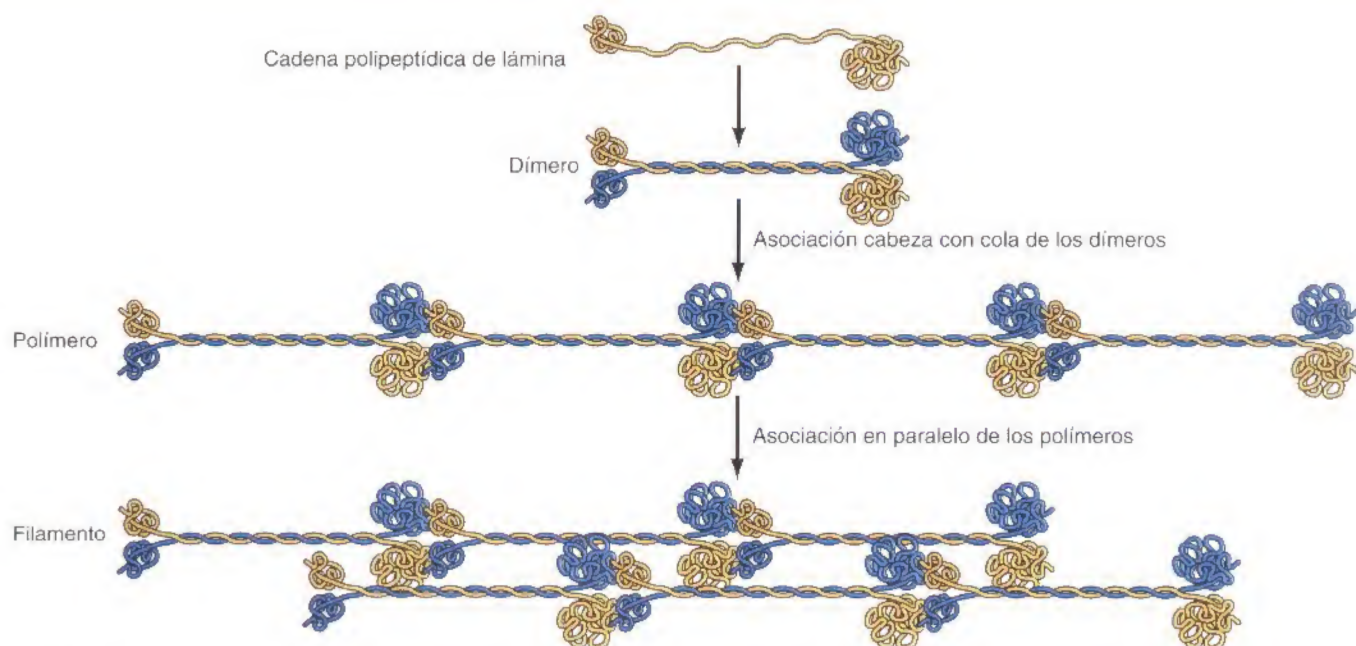



*Figura 8.4*
**Modelo de ensamblaje de las láminas.** Las láminas forman dímeros en los que las regiones centrales en α-hélice de dos cadenas polipeptídicas se enrollan una sobre otra. Un nivel superior de ensamblaje sería la asociación cabeza con cola de los dímeros para formar polímeros lineales y la asociación en paralelo de éstos para constituir filamentos.

Subyacente a la membrana nuclear interna se localiza la **lámina nuclear**, una red fibrosa que proporciona soporte estructural al núcleo (Fig. 8.3). La lámina nuclear está compuesta por una o varias proteínas relacionadas llamadas **láminas**. Por ejemplo, la mayoría de las células de mamíferos contienen cuatro tipos distintos de láminas llamadas A, $B_1$, $B_2$ y C. Todas las láminas son proteínas fibrosas de 60 a 80 Kilodaltons (kDa), relacionadas con las proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto (véase Cap. 11). Al igual que las otras proteínas de los filamentos intermedios, las láminas se ensamblan entre ellas para formar filamentos (Fig. 8.4). El primer nivel de asociación es la interacción entre dos láminas para formar un dímero en el que las zonas α-hélice de dos polipéptidos están enrolladas una alrededor de otra en una estructura llamada «bobina o espiral enrollada» (*coiled coil*). Los dímeros se asocian entre sí dando lugar a los filamentos que constituyen la lámina nuclear. La asociación entre las láminas y la membrana nuclear interna está facilitada por la adición postraduccional de lípidos —en particular, la prenilación de los residuos de cisteína carboxilo terminales (véase Fig. 7.32)—. Además, las láminas interaccionan con proteínas de la membrana nuclear interna, mediando su unión a la envuelta nuclear y localizando y organizándolas en el interior nuclear.

Una matriz de láminas nucleares de organización mucho más laxa se extiende hacia el interior del núcleo. Estas láminas sirven como sitios de unión para la cromatina. La cromatina en el interior del núcleo se organiza en grandes bucles de ADN, y regiones específicas de estos bucles se unen a la matriz de láminas. La organización laminar normal es esencial para la replicación del ADN y puede jugar un papel en la regulación de la transcripción.

## *Complejo del poro nuclear*

Los **complejos del poro nuclear** son los únicos canales a través de los cuales pueden viajar pequeñas moléculas polares, iones y macromoléculas (proteínas y ARNs) entre el núcleo y el citoplasma. El complejo del poro nuclear es una estructura muy grande con un diámetro de aproximadamente 120 nm y un peso molecular estimado de aproximadamente 125 millones de daltons —unas 30 veces el tamaño de un ribosoma—. En los vertebrados, el complejo del poro nuclear está compuesto por 50-100 proteínas distintas. Mediante el control del

tráfico de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, el complejo del poro nuclear tiene un papel fundamental en la fisiología de todas las células eucariotas. Las moléculas de ARN que son sintetizadas en el núcleo deben ser exportadas de manera eficiente al citoplasma, donde intervienen en la síntesis de proteínas. Por otro lado, las proteínas necesarias para las funciones nucleares (p. ej., factores de transcripción) deben entrar en el núcleo procedentes de los lugares de síntesis en el citoplasma. Además, muchas proteínas sufren un trasiego continuo entre el núcleo y el citoplasma.

Dependiendo de su tamaño, las moléculas pueden pasar a través del complejo del poro nuclear mediante uno de dos mecanismos diferentes (Fig. 8.5). Las moléculas pequeñas y algunas proteínas con un peso molecular inferior a 50 kDa. pasan libremente a través de la envuelta nuclear en ambas direcciones: del citoplasma al núcleo o del núcleo al citoplasma indistintamente. Estas moléculas difunden de manera pasiva a través de los canales acuosos abiertos, los cuales tienen un diámetro estimado de aproximadamente 9 nm, en el interior del complejo del poro nuclear. La mayoría de las proteínas y ARNs, sin embargo, no son capaces de pasar por estos canales abiertos. Estas macromoléculas atraviesan el complejo del poro nuclear mediante un proceso activo, en el que las proteínas y los ARNs adecuados son reconocidos y transportados selectivamente en una dirección específica (del núcleo al citoplasma o del citoplasma al núcleo).

La visualización de los complejos del poro nuclear por microscopía electrónica revela una estructura con una simetría de octámero organizada alrededor de un canal central grande (Fig. 8.6), que es la vía que utilizan las proteínas y los ARNs para atravesar la envuelta nuclear. Otros estudios estructurales más detallados, incluyendo el análisis de imágenes por ordenador, han permitido construir modelos tridimensionales del complejo del poro nuclear (Fig. 8.7). Estos modelos muestran que el complejo del poro nuclear está formado por ocho radios ensamblados alrededor de un canal central. Estos radios están unidos a dos anillos, uno en la superficie nuclear y otro en la citoplasmática, y esta estructura de radio-anillo está anclada a la envuelta nuclear en los sitios de fusión entre las membranas nuclear interna y externa. Filamentos de proteínas se extienden desde el anillo citoplasmático y nuclear, formándose una estructura característica en forma de cesta en el lado nuclear. Cambios en la conformación del canal central durante el paso de macromoléculas modifican su apertura desde 9 nm hasta 40 nm, lo que es lo suficientemente amplio como para acomodar a las mayores partículas capaces de atravesar la envuelta nuclear.

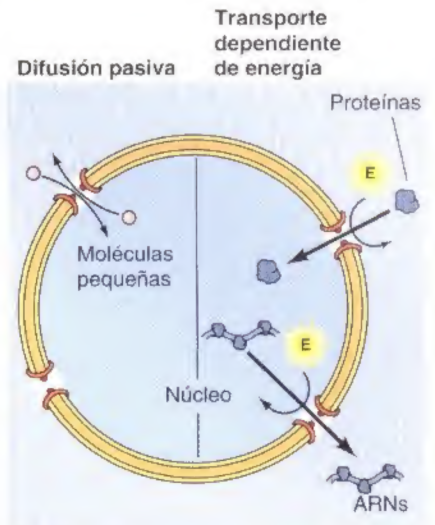



*Figura 8.5*
**Tráfico molecular a través de los complejos del poro nuclear.** Las moléculas pequeñas son capaces de atravesar rápidamente los canales abiertos del complejo del poro nuclear por difusión pasiva. Por el contrario, las macromoléculas son transportadas por mecanismos selectivos dependientes de energía que intervienen principalmente para importar proteínas al núcleo y exportar ARNs al citoplasma.

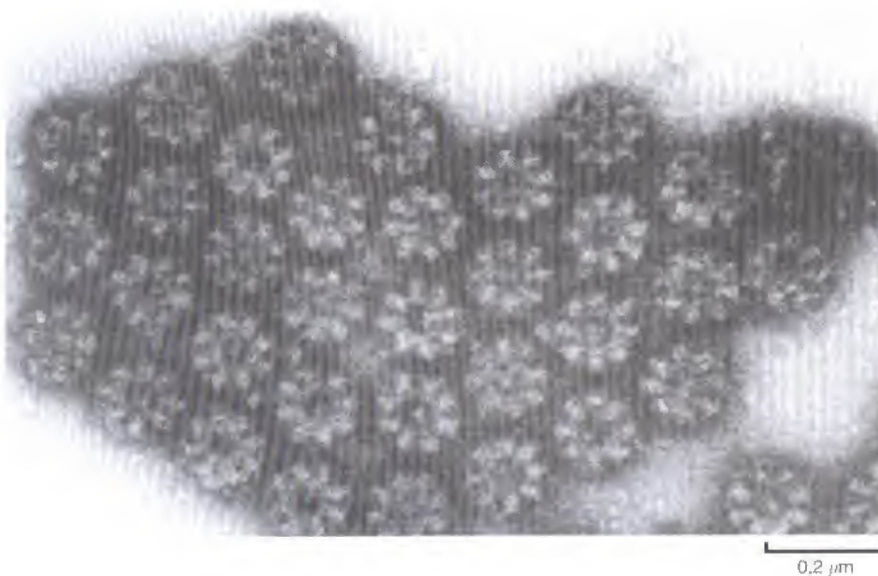



*Figura 8.6*
**Micrografía electrónica de los complejos del poro nuclear.** En esta vista frontal, los complejos del poro nuclear parecen estar constituidos por ocho subunidades estructurales alrededor de un canal central. (Cortesía del Dr. Ron Milligan, The Scripps Research Institute.)

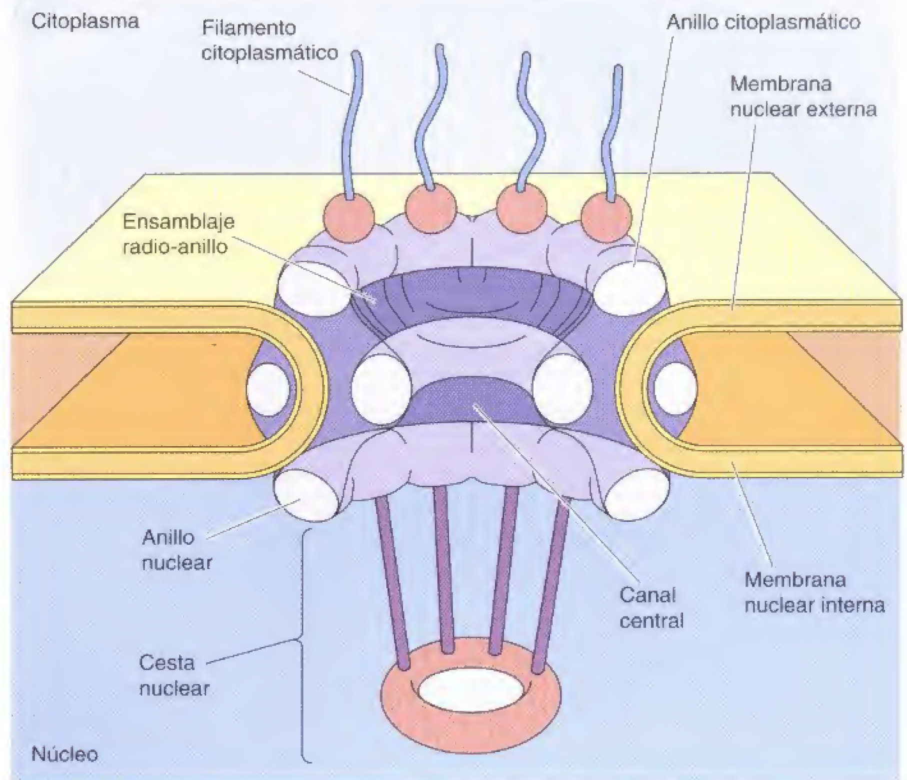



*Figura 8.7*
**Modelo del complejo del poro nuclear.** El complejo se organiza en ocho radios unidos a sendos anillos en la cara citoplasmática y nuclear de la envuelta nuclear. Toda la estructura radio-anillo se ensambla alrededor de un canal central. Los filamentos citoplasmáticos se extienden desde el anillo citoplasmático, y los filamentos que forman la estructura en forma de cesta se extienden desde el anillo nuclear.

## *Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo*

El mecanismo del tráfico selectivo a través de la envuelta nuclear se encuentra mejor caracterizado en el caso de las proteínas que son importadas desde el citoplasma al núcleo. Estas proteínas son las responsables de todas las características de la estructura y de la función del genoma; incluyen las histonas, las ADN polimerasas, las ARN polimerasas, factores de transcripción, factores de *splicing* y muchas otras. Estas proteínas se etiquetan para ser destinadas al núcleo con secuencias de aminoácidos específicas, denominadas **señales de localización nuclear**, que dirigen su transporte a través del complejo del poro nuclear.

Alan Smith y colaboradores, en 1984, caracterizaron en detalle la primera señal de localización nuclear. Estos investigadores estudiaron el antígeno T del virus de simio SV40, una proteína codificada por el virus que inicia la replicación del ADN viral en las células infectadas (véase Cap. 5). Como era de esperar en una proteína que interviene en la replicación, el antígeno T se suele localizar en el núcleo. La señal responsable para su localización nuclear se identificó al encontrarse que una mutación en un único residuo de lisina impide que el antígeno T se transporte al núcleo, lo que da lugar a su acumulación en el citoplasma de la célula infectada. Estudios posteriores caracterizaron la señal de localización nuclear del antígeno T como una secuencia formada por siete aminoácidos: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Esta secuencia no sólo era necesaria para el transporte nuclear del antígeno T, sino que al añadirse a otras proteínas, normalmente citoplasmáticas, causaba su acumulación en el núcleo.

Desde entonces se han identificado señales de localización nuclear en muchas otras proteínas. La mayoría de estas secuencias, como la del antígeno T, son cortas y ricas en aminoácidos básicos (lisina y arginina). En muchos otros casos, sin embargo, los aminoácidos que forman la señal de localización nuclear están juntos pero no necesariamente contiguos en la secuencia. Por ejemplo, la

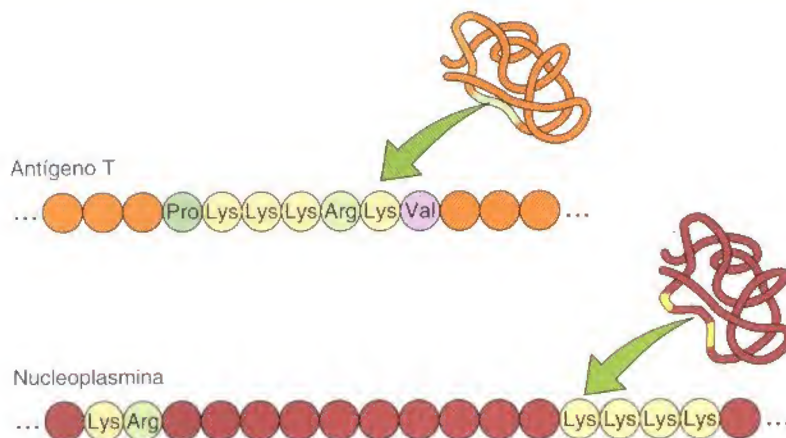


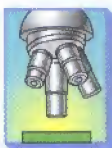

*Figura 8.8*
**Señales de localización nuclear.** La señal de localización nuclear del antígeno T es una corta secuencia de aminoácidos. Por el contrario, la señal de localización nuclear de la nucleoplasmina es una secuencia bipartita, formada por una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia Lys-Lys-Lys-Lys.

señal de localización nuclear de la nucleoplasmina (una proteína que participa en el ensamblaje de la cromatina) consta de dos partes: una secuencia Lys-Arg separada por diez aminoácidos de otra secuencia de cuatro lisinas (Fig. 8.8). Tanto las secuencias Lys-Arg como Lys-Lys-Lys-Lys son necesarias para el transporte nuclear, pero los diez aminoácidos entre estas secuencias pueden sufrir mutaciones sin afectar al transporte nuclear. Debido a que esta secuencia de localización nuclear está compuesta por dos elementos separados, se denomina secuencia bipartita. Parece ser que motivos bipartitos similares actúan como señales de localización en muchas otras proteínas nucleares, e incluso puede que sean más frecuentes que la señal de localización nuclear sencilla del antígeno T. Mientras que muchas señales de localización nuclear consisten en estos residuos aminoacídicos básicos, a menudo denominado señal de localización nuclear básica o «clásica», las secuencias aminoacídicas y estructuras de otras señales de localización nuclear varían considerablemente.

Dos tipos de proteínas juegan papeles críticos en el importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear: un receptor de transporte nuclear y una pequeña proteína que se une a GTP denominada **Ran**, relacionada con las proteínas Ras. Existen dos tipos de receptores de transporte nuclear (**carioferinas**): las **importinas**, que transportan macromoléculas al interior nuclear desde el citoplasma, y las **exportinas**, que exportan macromoléculas desde el núcleo hasta el citoplasma (Tabla 8.1). Algunas importinas (Kap$\beta$1) actúan con una carioferina adaptadora (Kap$\alpha$) formando un heterodímero, que importa proteínas que contienen la señal de localización nuclear básica.

**TABLA 8.1.** Carioferinas con sustratos conocidos

| Carioferina | Organismo | Sustratos |
|---|---|---|
| **Importe** | | |
| Dímero Kap$\alpha$/Kap$\beta$1 | Humano | Proteínas con una señal de localización nuclear de aminoácidos básica (p. ej., nucleoplasmina) |
| Esnurportina | Humano | RNPsn (U1, U2, U4, U5) |
| Kap$\beta$1 sólo | Humano | Complejos Cdk/ciclina |
| Kap$\beta$2 (transportina) | Humano | Proteínas de unión a ARNm |
| Kap$\beta$3 | Humano | Proteínas ribosómicas |
| Importina7/dímero Kap$\beta$1 | Humano | Histona H1 |
| **Exporte** | | |
| Crm1 | Vertebrados | Proteínas con una señal de exportación rica en leucina |
| CAS | Humano | Kap$\alpha$ |
| Exportina-t | Humano | ARNt |
| Exportina-4 | Ratón | Factor de elongación 5A |



Experimento clave

## *Identificación de las señales de localización nuclear*

**Corta secuencia de aminoácidos capaz de especificar la localización nuclear**
Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson y Alan E. Smith
National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres
*Cell, Volumen 39, 1984, págs. 499-509*

### Contexto

El mantenimiento del núcleo como un compartimento bioquímicamente distinto, requiere un mecanismo que permita segregar las proteínas entre el núcleo y el citoplasma. Los estudios realizados en la década de los 70 constataron que las moléculas pequeñas difundían rápidamente a través de la envuelta nuclear, pero que la mayoría de las proteínas no podían hacerlo. Por esta razón, parecía que las proteínas nucleares eran reconocidas de manera especifica e importadas selectivamente al núcleo, desde su lugar de síntesis en los ribosomas citoplasmáticos.

Los experimentos anteriores realizados por Günter Blobel y colaboradores demostraron que las proteínas son etiquetadas para dirigirse al retículo endoplásmico por secuencias señal constituidas por un grupo corto de aminoácidos (véase Cap. 9). En este artículo de 1984, Alan Smith y colaboradores extendieron este principio para el etiquetado de las proteínas destinadas al núcleo, identificando una secuencia corta de aminoácidos que actúa como una señal de localización nuclear.

### Experimentos

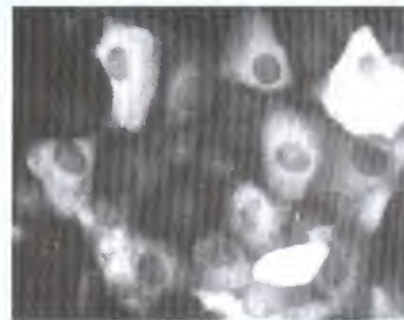
Se utilizó el antígeno T del virus SV40 como la proteína modelo para los estudios de localización nuclear en células animales. El antígeno T es una proteína de 94 kDa. necesaria para la replicación del ADN del SV40, y normalmente se localiza en el núcleo de las células infectadas por este virus. Experimentos anteriores realizados en el laboratorio de Alan Smith y en el de Janet Butel (Lanford and Butel, 1984, *Cell* 37: 801-813), demostraron que la mutación de la Lys-128 siendo sustituida por treonina o asparragina impedía la acumulación del antígeno T en el núcleo, tanto en células de ratón como de mono. En vez de transportarse al núcleo, estos antígenos T mutados permanecían en el citoplasma, lo que sugería que la Lys-128 formaba parte de una señal de localización nuclear. Kalderon y colaboradores comprobaron esta hipótesis usando dos aproximaciones experimentales distintas.

Primero, determinaron los efectos de varias deleciones sobre la localización subcelular del antígeno T. Se observó que los antígenos T mutados, con deleciones de las regiones de la cadena peptídica comprendidas entre los residuos de aminoácidos 1-126 o entre el residuo 136 y el extremo carboxilo terminal, se acumulaban normalmente en el núcleo. Por el contrario las deleciones que afectaban desde el aminoácido 127 al 132, provocan la retención de los antígenos T en el citoplasma. Así, parecía que la secuencia de aminoácidos entre el residuo 127 y el 132 era la responsable de la localización nuclear del antígeno T.

(A)



(B)



Las células fueron microinyectadas con ADNs de plásmidos que codificaban proteínas quiméricas en las que los aminoácidos del antígeno T de SV40 se habían fusionado a la piruvato quinasa. La localización celular de las proteínas de fusión se determinó por microscopía de fluorescencia. (A). La proteína de fusión contiene una señal de localización nuclear de SV40 intacta (aminoácidos 126 a 132). (B) La señal de localización nuclear se ha inactivado por la deleción de los aminoácidos 131 y 132.

Durante el importe de proteínas, una importina específica reconoce la secuencia de localización nuclear sobre la proteína. Su capacidad de hacerlo se ve facilitada mediante la interacción con Ran. La conformación y la actividad de Ran está regulada por la unión e hidrólisis de GTP, al igual que Ras (véase Fig. 7.36) o diversos factores de traducción implicados en la síntesis proteica (véase Fig. 7.13). Las enzimas que estimulan el intercambio de GDP por GTP

### *Identificación de las señales de localización nuclear* (continuación)

Para determinar si esta secuencia de aminoácidos era capaz de dirigir otras proteínas al núcleo, los investigadores crearon quimeras en las cuales la secuencia de aminoácidos del antígeno T se fusionó con proteínas que normalmente se localizaban en el citoplasma. Estos experimentos demostraron que la adición de los aminoácidos 126 a 132 del antígeno T a la $\beta$-galactosidasa o a la piruvato quinasa era suficiente para provocar la acumulación de estas proteínas citoplasmáticas en el núcleo de la célula (véase Figura). Por lo tanto, esta corta secuencia de aminoácidos del antígeno T del SV40 actúa como una señal de localización nuclear, que es suficiente y necesaria para etiquetar las proteínas de tal manera que sean transportadas al interior del núcleo.

#### Impacto

Como Kalderon y sus colaboradores sugirieron en su artículo de 1984, la señal de localización nuclear del antígeno T del SV40 ha resultado «ser un prototipo de secuencias similares en otras proteínas nucleares». Mediante el marcaje de las proteínas para su transporte al núcleo, estas señales son fundamentales para establecer la identidad bioquímica del núcleo y mantener la división de las células eucariotas en dos compartimentos: núcleo y citoplasma. En la actualidad se sabe que las señales de localización nuclear son reconocidas por receptores citoplasmáticos que transportan a sus proteínas sustrato al complejo del poro nuclear. Aunque los mecanismos de transporte a través del complejo del poro nuclear todavía no se han clarificado, la identificación de las señales de localización nuclear fue un avance fundamental para comprender el transporte de proteínas al núcleo.



Alan Smith

sobre Ran se localizan en el lado nuclear de la envuelta nuclear, mientras que las enzimas que estimulan la hidrólisis de GTP se localizan en el lado citoplásmico. En consecuencia, existe un gradiente de Ran/GTP a través del poro nuclear, con una elevada concentración de Ran/GTP en el núcleo y una elevada concentración de Ran/GDP en el citoplasma. Se cree que este gradiente de Ran/GTP determina la direccionalidad del transporte nuclear.

El importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear puede dividirse en un ciclo de cinco pasos (Fig. 8.9). En el primer paso, el complejo importina-Ran/GDP se une a la proteína mercancía que posee la señal de localización nuclear. Durante el segundo paso este complejo mercancía-receptor se une a proteínas de los filamentos citoplásmicos del complejo del poro nuclear. El transporte ahora procede mediante la unión secuencial a proteínas específicas del poro nuclear localizadas cada vez más próximas al lado nuclear del complejo del poro. El tercer paso en el ciclo del importe de proteínas tiene lugar en el núcleo donde el GDP unido a Ran es intercambiado por GTP. Esto causa un cambio en la conformación de la importina y desplaza a la proteína mercancía, liberándola en el núcleo. En el cuarto paso, el complejo importina-Ran/GTP se exporta a través del complejo del poro nuclear. El paso final tiene lugar en el citoplasma, donde el GTP es hidrolizado a GDP para regenerar el Ran/GDP necesario para la siguiente ronda de transporte.

Algunas proteínas permanecen en el interior del núcleo una vez transportadas desde el citoplasma, pero muchas otras viajan continuamente entre el núcleo y el citoplasma. Algunas de estas proteínas actúan como transportadores (*carriers*) de otras moléculas, como los ARNs; otras coordinan las funciones nucleares y citoplasmáticas (p. ej., regulando la actividad de los factores de transcripción). Las proteínas se etiquetan para ser exportadas del núcleo mediante una secuencia de aminoácidos específica, llamada **señal de exportación nuclear**. Al igual que las señales de localización nuclear, las señales de exportación nuclear son reconocidas por receptores en el interior del núcleo que dirigen el transporte de las proteínas a través del complejo del poro nuclear al

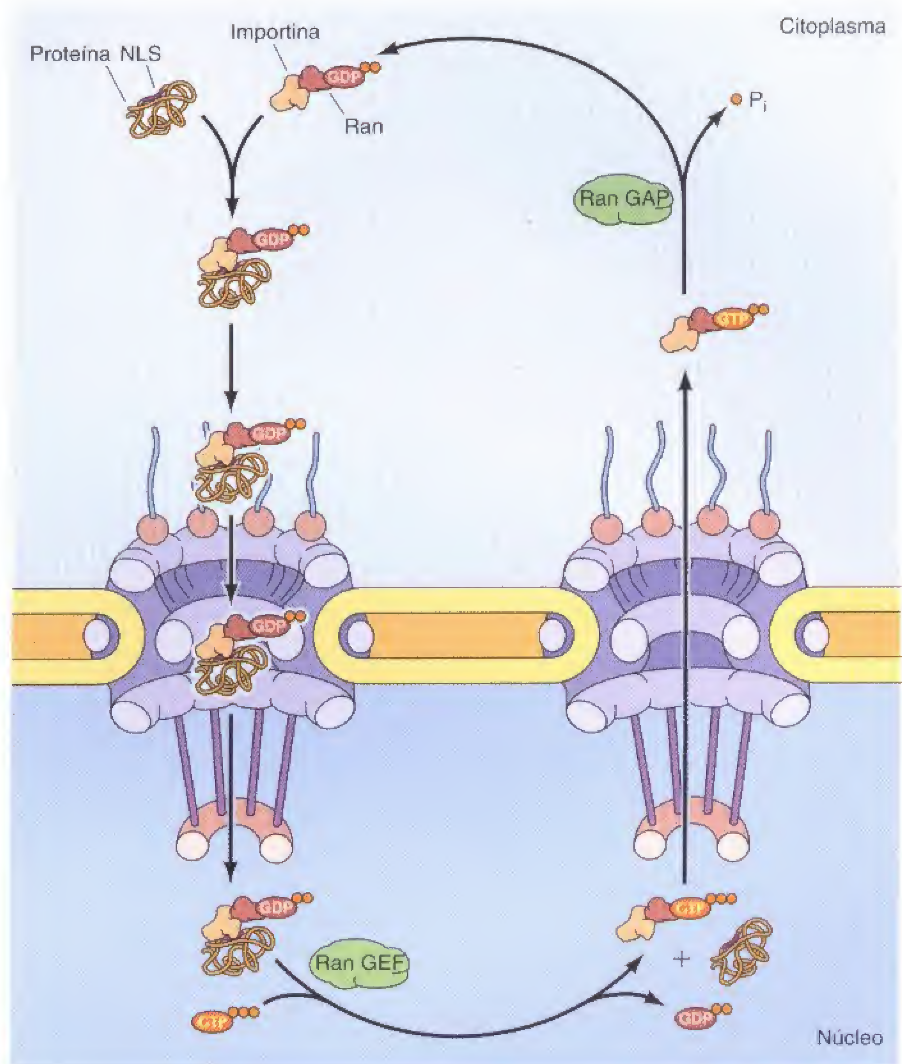



*Figura 8.9*
**Importe de proteínas a través del complejo del poro nuclear.** Las proteínas se transportan a través del complejo del poro nuclear en un ciclo de cinco pasos. En el primer paso, la proteína que posee una señal de localización nuclear (NLS) es reconocida por una importina que forma un complejo con la proteína pequeña de unión a GTP, Ran. En el segundo paso, el complejo formado por la mercancía (la proteína que posee la secuencia de localización nuclear)-importina-Ran/GDP se une a una proteína específica del poro nuclear presente en los filamentos citoplásmicos. En el paso número tres, el complejo se transloca a través del poro nuclear mediante la adhesión secuencial a proteínas del poro. En el cuarto paso, la actividad del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Ran GEF) nuclear intercambia el GDP unido a Ran por GTP, alterando la configuración del complejo de modo que la proteína mercancía es liberada. En el quinto paso, este complejo importina-Ran/GTP es reexportado a través del poro nuclear y la proteína activadora de GTPasas (Ran GAP) citoplásmica hidroliza el GTP unido a Ran a GDP.

citoplasma. Muchas exportinas también forman parte de la familia de proteínas de las carioferinas (ver Tabla 8.1). Al igual que la importina $\beta$, las exportinas se unen a Ran, necesaria tanto para la exportación nuclear como para la importación nuclear (Fig. 8.10). Sorprendentemente, sin embargo, Ran/GTP promueve la formación de complejos estables entre las exportinas y las proteínas diana, mientras que disocia los complejos entre las importinas y sus proteínas diana. Este efecto de la unión de Ran/GTP sobre las exportinas dirige el movimiento de las proteínas con señales de exportación nuclear desde el núcleo al citoplasma. Por tanto, las exportinas forman complejos estables con sus proteínas diana y con Ran/GTP en el interior del núcleo. Una vez que se ha producido el transporte al lado citosólico de la envuelta nuclear, la hidrólisis de GTP provoca la disociación de la proteína diana, que es liberada en el citoplasma.

## *Regulación del transporte de proteínas al núcleo*

Un aspecto interesante del transporte de proteínas al interior del núcleo es que constituye otro nivel de control de la actividad de las proteínas nucleares. Por ejemplo, los factores de transcripción sólo son funcionales cuando están presentes en el núcleo, por lo que la regulación de su transporte al núcleo es otra forma de control de la expresión génica. Como se discutirá en el Capítulo 13, el

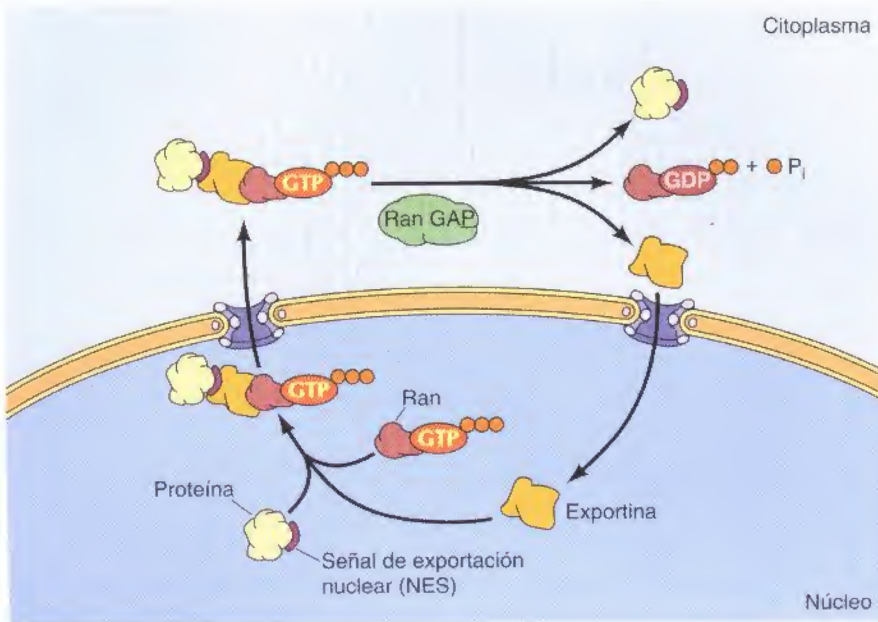



*Figura 8.10*
**Exportación nuclear.** En el núcleo se forman los complejos entre las proteínas diana que contienen señales de exportación nuclear (NES), las exportinas y Ran/GTP. Tras el transporte a través del complejo del poro nuclear, Ran GAP induce la hidrólisis del GTP unido, dando lugar a Ran/GDP y a la liberación de la proteína diana y de la exportina en el citoplasma. La exportina finalmente es transportada de nuevo al núcleo.

transporte regulado al núcleo de los factores de transcripción y de las proteína quinasas tiene un papel importante en el control del comportamiento de las células en respuesta a los cambios ambientales, porque proporciona un mecanismo por el cual las señales recibidas en la superficie celular pueden ser transmitidas al núcleo.

En uno de los mecanismos de regulación, los factores de transcripción (u otras proteínas) se asocian con proteínas citoplasmáticas que enmascaran las señales de localización nuclear; puesto que ya no se reconocen estas señales, las proteínas permanecen en el citoplasma. Un buen ejemplo lo aporta el factor de transcripción NF-κB, que activa la transcripción de las cadenas ligeras κ de las inmunoglobulinas en los linfocitos B (Fig. 8.11). En las células no estimuladas, NF-κB se encuentra formando un complejo inactivo con una proteína inhibidora (IκB) en el citoplasma. La unión a I-κB parece enmascarar la señal de localización nuclear de NF-κB, y se impide su transporte al núcleo. En las células estimuladas, IκB se fosforila y degrada por proteolisis mediada por ubiquitinas, lo que permite que NF-κB entre al interior del núcleo y active la transcripción de sus genes diana.

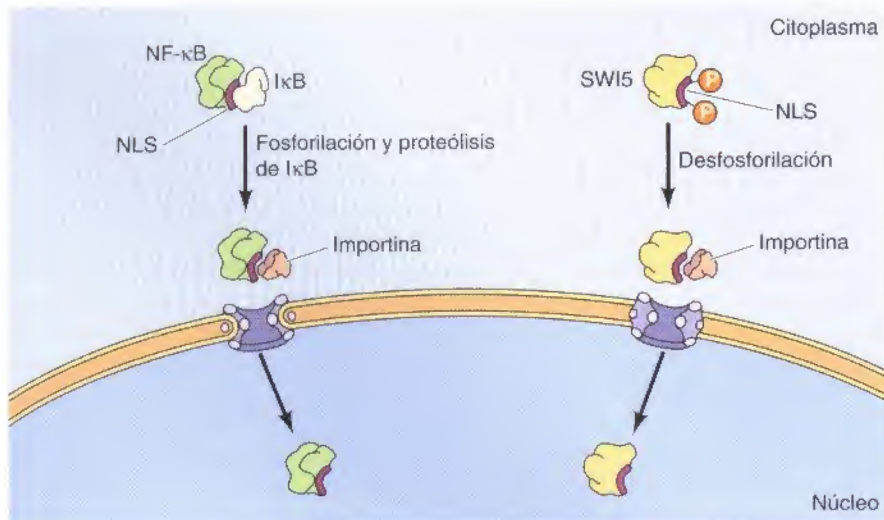



*Figura 8.11*
**Regulación del transporte al núcleo de factores de transcripción.** El factor de transcripción NF-κB forma un complejo inactivo con IκB, que enmascara su secuencia de localización nuclear (NLS) y se retiene en el citoplasma. En respuesta a una señal extracelular adecuada, IκB es fosforilado y degradado por proteólisis, permitiendo la entrada de NF-κB al núcleo. En cambio, el factor de transcripción SWI5 de levadura es retenido en el citoplasma debido a la fosforilación de una región próxima a la secuencia de localización nuclear. La desfosforilación regulada expone la NLS y permite que SWI5 sea transportado al núcleo en la etapa adecuada del ciclo celular.

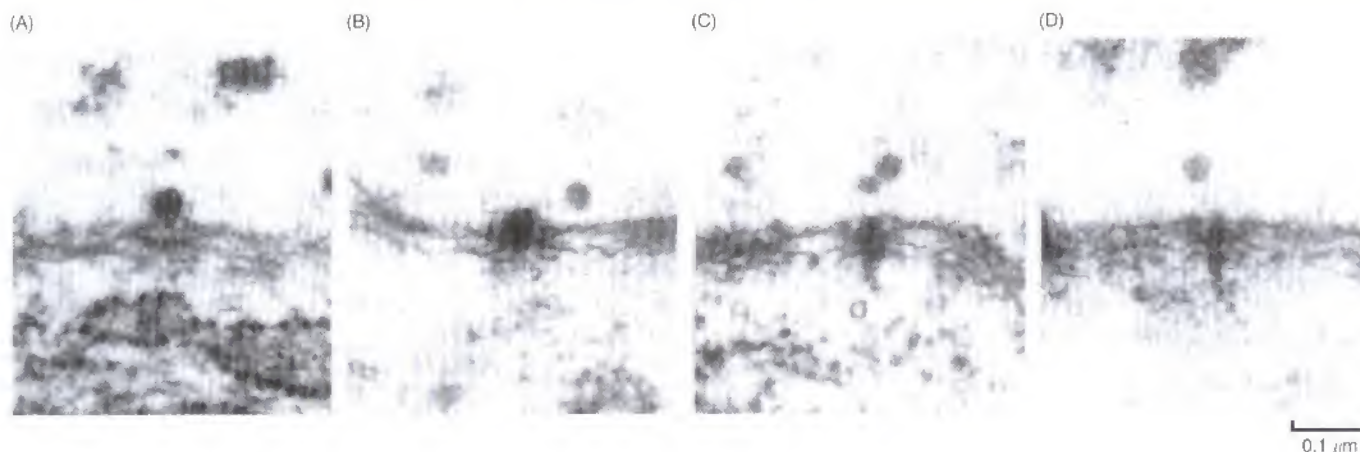



*Figura 8.12*
**Transporte de un complejo ribonucleoproteínico.** Las células de las glándulas salivares de los insectos producen grandes complejos ribonucleoproteínicos (RNPs), formados por 35 a 40 Kilobases de ARN y con un peso molecular total aproximado de 30 millones de daltons. Esta serie de micrografías electrónicas muestra la unión de una RNP a un complejo del poro nuclear (A) y el despliegue del ARN durante su translocación al citoplasma (B-D). (De H. Mehlin *et al.*, 1992. *Cell* 69:605.)

El transporte al interior del núcleo de otros factores de transcripción está regulado directamente por su fosforilación, más que por la asociación con proteínas inhibidoras. Por ejemplo, el factor de transcripción de levaduras SWI5 es transportado al interior del núcleo sólo en una etapa concreta del ciclo celular (véase Fig. 8.11). Si no, este factor permanece en el citoplasma como resultado de la fosforilación de residuos de serina próximos a la señal de localización nuclear, lo que impide su transporte al núcleo. La desfosforilación regulada de este residuo activa al SWI5 en la etapa adecuada del ciclo celular y permite que sea transportado al núcleo.

## *Transporte de ARNs*

Mientras que muchas proteínas son transportadas selectivamente desde el citoplasma al núcleo, la mayoría de los ARNs son exportados desde el núcleo al citoplasma. Puesto que las proteínas se sintetizan en el citoplasma, la salida de los ARNm, ARNr y ARNt es un proceso fundamental en la expresión génica en las células eucariotas. Al igual que la entrada de las proteínas al núcleo, la salida de los ARNs a través de los complejos del poro nuclear es un proceso activo, dependiente de energía, que requiere la intervención de la proteína Ran que une GTP.

Los ARNs son transportados a través de la envuelta nuclear como complejos ribonucleoproteína (RNPs) (Fig. 8.12). Algunas proteínas del complejo poseen señales de exportación nuclear que son reconocidas por los receptores de transporte nucleares (véase Fig. 8.10). Los pre-ARNm y ARNm se asocian con un conjunto de al menos 20 proteínas (formando un complejo pre-ARNm-proteína) durante su procesamiento en el núcleo y transporte al citoplasma (véase Capítulo 6). Al menos dos proteínas del RNPm contienen señales de exporte nuclear y se cree que funcionan como transportadoras de ARNm durante su exportación al citoplasma. Los ARNs ribosómicos se asocian en primer lugar con proteínas ribosómicas y con proteínas específicas del procesamiento de ARN en el nucleolo, y las subunidades 60S y 40S nacientes son entonces transportadas al citoplasma (véase Fig. 8.28). Su exportación del núcleo está mediada por señales de exporte nuclear presentes en las proteínas del complejo de la subunidad. En el caso de los ARNt, las proteínas específicas que median el exporte nuclear no han sido identificadas.

A diferencia de los ARNm, los ARNt y los ARNr, que funcionan en el citoplasma, muchos ARNs pequeños (ARNsn y ARNsno) intervienen en el núcleo como componentes de la maquinaria del procesamiento del ARN. De manera quizás sorprendente, estos ARNs se transportan inicialmente desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar RNPsn funcionales y entonces regresan al núcleo (Fig. 8.13). Las proteínas que se unen a los cap de

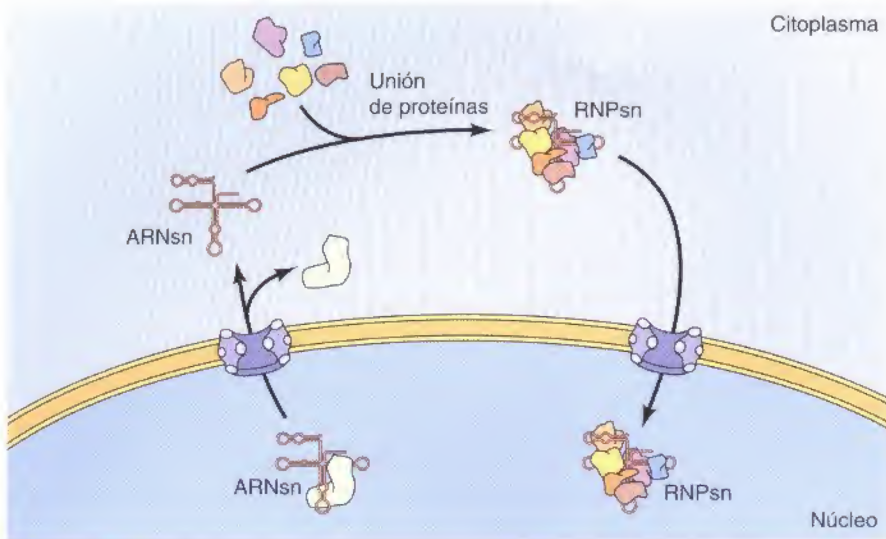



*Figura 8.13*
**Transporte de los ARNsn entre el núcleo y el citoplasma.** Los ARNs pequeños nucleares son exportados primero desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar RNPsn. Las RNPsn una vez ensambladas son de nuevo transportadas al interior del núcleo.

los extremos 5' de los ARNsn parecen estar implicadas en la exportación de los ARNsn al citoplasma, mientras que las secuencias presentes en las proteínas RNPsn son las responsables del transporte de los RNPsn desde el citoplasma al núcleo.

## Organización interna del núcleo

El núcleo es más que un almacén en el que la cromatina, ARNs y proteínas nucleares pueden moverse libremente en una solución acuosa. Por el contrario, el núcleo parece tener una estructura interna que organiza el material genético y localiza las funciones nucleares a sitios o dominios específicos. La mayoría de éstos, si no todos, parecen basarse en la estructura y localización altamente organizada de la cromatina en el interior nuclear.

### *Cromosomas y estructura de orden superior de la cromatina*

La cromatina se condensa durante la mitosis para formar los cromosomas compactos metafásicos que se distribuirán a los núcleos hijos (véase Fig. 4.15). Durante la interfase, una parte de la cromatina (**heterocromatina**) permanece muy condensada y es transcripcionalmente inactiva; el resto de la cromatina (**eucromatina**) está descondensada y distribuida por todo el núcleo (Fig. 8.14). Las células contienen dos tipos de heterocromatina. La heterocromatina constitutiva está formada por secuencias de ADN que nunca se transcriben, como las secuencias satélite localizadas en los centrómeros de los cromosomas. La heterocromatina facultativa contiene secuencias que no se transcriben en la célula observada, pero que sí se transcriben en otros tipos celulares. Por lo tanto, la cantidad de heterocromatina facultativa varía dependiendo de la actividad transcripcional de la célula.

Aunque la cromatina interfásica parece que se distribuye uniformemente, los cromosomas realmente se disponen de manera organizada y se dividen en distintos dominios funcionales que desempeñan un papel fundamental en la

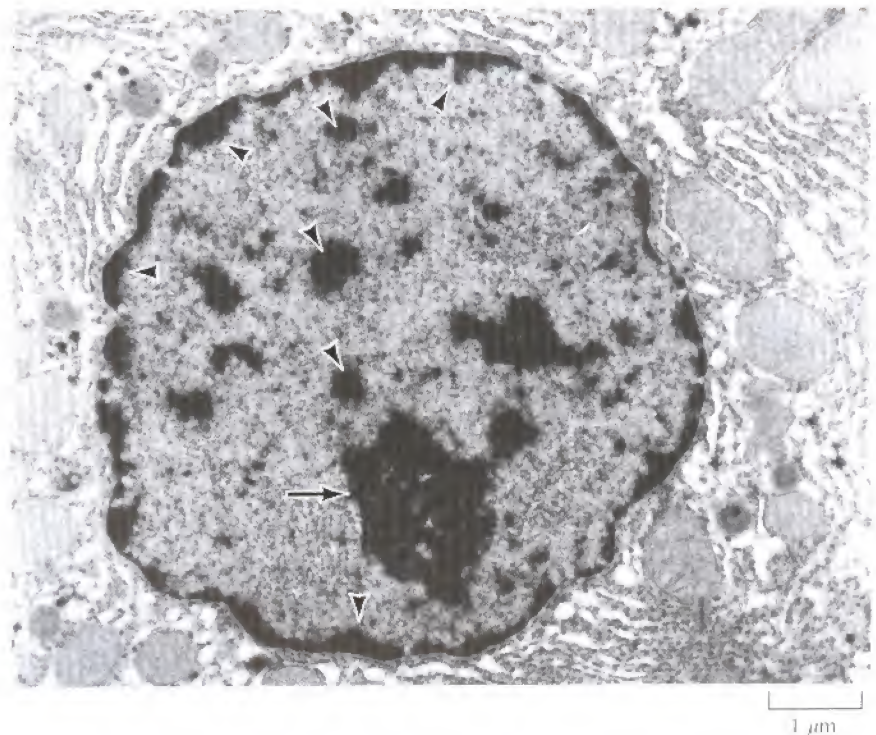



*Figura 8.14*
**Heterocromatina en un núcleo interfásico.** La eucromatina está distribuida por todo el núcleo. La heterocromatina se indica con los triángulos y el nucléolo con la flecha. (Cortesía de Ada L. Olins y Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

regulación de la expresión génica. La distribución no aleatoria de la cromatina dentro del núcleo interfásico fue sugerida por primera vez en 1885 por C. Rabl, que propuso que cada cromosoma ocupaba una zona concreta, con los centrómeros y los telómeros adheridos a lados opuestos de la envuelta nuclear (Fig. 8.15). Este modelo básico de organización cromosómica fue confirmado unos 100 años después (en 1984) mediante estudios detallados de los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *Drosophila*. En vez de localizarse al azar, enrollados unos con otros, se encontró que cada cromosoma ocupaba un lugar determinado en el interior nuclear (Fig. 8.16). Los cromosomas están íntimamente asociados a la envuelta nuclear en muchos puntos.

(A)



(B)



*Figura 8.15*
**Organización cromosómica.**
Reproducción de unos bocetos de cromosomas en células de salamandra. (A) Cromosomas completos. (B) Sólo los telómeros (localizados en la membrana nuclear). (De C. Rabl, 1885. *Morphologisches Jahrbuch* 10: 214.)

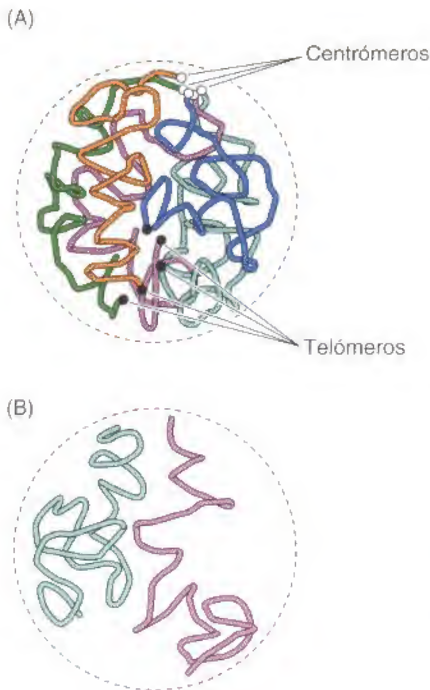


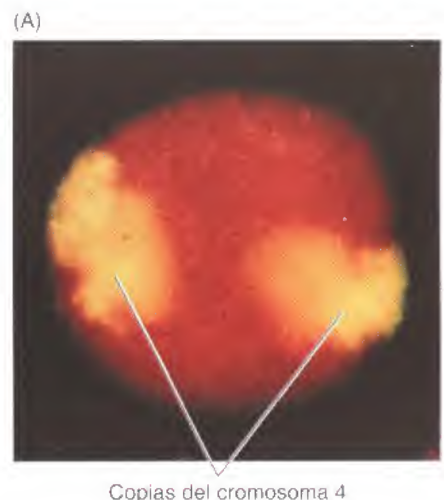

*Figura 8.16*
**Organización de los cromosomas de *Drosophila*.** (A) Un modelo del núcleo, mostrando 5 brazos cromosómicos con distintos colores. Se indica la posición de los telómeros y los centrómeros. (B) Los dos brazos del cromosoma 3 se muestran para ilustrar la separación topológica entre los cromosomas. (De D. Mathog *et al.*, 1984. *Nature* 308: 414.)

Cada uno de los cromosomas también ocupa una zona distinta en el núcleo de las células de mamífero (Fig. 8.17). Los genes que se transcriben activamente parece que se localizan en la periferia de estas zonas, próximos a unos canales que separan los cromosomas. Se cree que los ARNs recién transcritos son liberados a estos canales entre los cromosomas, donde tiene lugar el procesamiento del ARN. Gran parte de la heterocromatina se localiza en la periferia del núcleo porque las proteínas asociadas con la heterocromatina se unen a la matriz de la lámina nuclear. Puesto que distintos tipos celulares expresan diferentes genes, su heterocromatina facultativa es diferente y distintas regiones de sus cromosomas interaccionan con la lámina nuclear en las diversas células y tejidos. Algunas células poseen sus centrómeros y telómeros agrupados en polos opuestos, mientras que otras poseen sus cromosomas organizados radialmente. Aunque las localizaciones de los cromosomas en el interior nuclear no son aleatorias, probablemente difieren entre los distintos tejidos y organismos.

Al igual que el ADN en los cromosomas metafásicos (véase Fig. 4.13), la cromatina de los núcleos interfásicos parece que está organizada en dominios en forma de bucle que contienen de 50 a 100 Kb de ADN. Un buen ejemplo de esta organización en dominios en forma de bucle lo representan los cromosomas de oocitos de anfibios, con una alta tasa de transcripción; en estos, las regiones de ADN que se transcriben activamente se visualizan como grandes bucles de cromatina descondensada (Fig. 8.17). Estos dominios de cromatina parece que representan unidades funcionales discretas, que de manera independiente regulan la expresión génica (véase Capítulo 6).

## *Dominios funcionales en el interior del núcleo*

La organización interna del núcleo está demostrada por la localización de otros procesos nucleares a regiones concretas del núcleo. Una variedad de componentes del núcleo se localizan en estructuras o dominios subnucleares concretos. Sin embargo, la naturaleza y función de estas subestructuras nucleares todavía no están claras, y la comprensión de la organización del interior nuclear en dominios funcionales es un campo inexplorado de la biología celular.



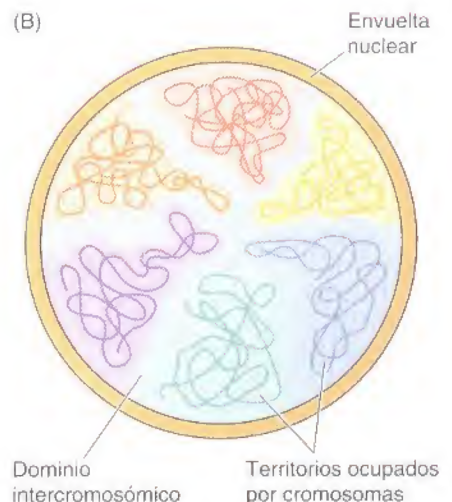




*Figura 8.17*
**Organización de los cromosomas en los núcleos de mamíferos.** (A) Hibridación de sondas dirigidas contra secuencias del cromosoma 4 en células humanas. Las dos copias del cromosoma, identificadas con fluorescencia amarilla, se localizan en zonas distintas del núcleo. (B) Un modelo de organización cromosómica. Los cromosomas ocupan zonas definidas, separadas por dominios intercromosómicos donde se cree que ocurre el procesamiento y el transporte del ARN. (A, cortesía de Thomas Cremer, Ludwig Maximilians University, de A. I. Lamond y W. C. Earnshaw, 1998. *Science* 280: 547.)

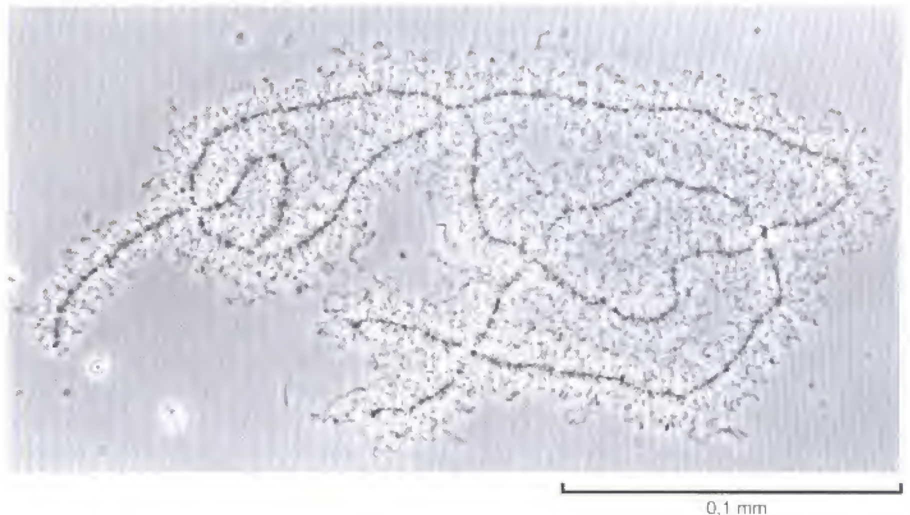



*Figura 8.18*
**Dominios en bucle de la cromatina.** Micrografía al microscopio óptico de un cromosoma de oocito de anfibio, mostrando los bucles de cromatina descondensada, que está siendo activamente transcrita, extendiéndose desde un eje de cromatina no transcrita, altamente condensada. (Cortesía de Joseph Gall, Carnegie Institute.)

Los núcleos de las células de mamífero parecen contener sitios agrupados de replicación del ADN, en los cuales tiene lugar la replicación de múltiples moléculas de ADN. Estos sitios discretos de replicación del ADN se han caracterizado mediante experimentos que permiten visualizar en el interior de los núcleos celulares la síntesis de nuevas moléculas de ADN (Fig. 8.19). Esto se consiguió marcando las células con bromodeoxiuridina —un análogo de la timidina que puede ser incorporado al ADN y detectado marcándolo con anticuerpos fluorescentes—. En tales experimentos, el ADN recién sintetizado se detectó en, aproximadamente, 200 agrupaciones discretas distribuidas por todo el núcleo. Dado que una célula diploide de mamífero posee aproximadamente 4.000 orígenes de replicación activos en un momento determinado, cada una de estas agrupaciones de replicación del ADN debe contener unas 40 horquillas de replicación. Por lo tanto, parece ser que la replicación tiene lugar en estructuras grandes que contienen múltiples complejos de replicación organizados en distintos dominios funcionales, denominados fábricas de replicación.

Los genes que se transcriben activamente parece que se distribuyen por todo el núcleo, pero los componentes de la maquinaria de *splicing* se concentran en dominios estructurales subnucleares discretos. La localización de los componentes responsables del *splicing* en dominios discretos en el núcleo se ha detectado por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra RNPsn y factores de *splicing* (Fig. 8.20). En vez de distribuirse uniformemente por todo el núcleo, los componentes del aparato de *splicing* están concentrados en 20 a 50 estructuras discretas denominadas motas nucleares. Se cree que estos puntos son el sitio de almacén de los componentes responsables del *splicing*, y desde aquí son reclutados hacia los genes activamente transcritos, donde ocurre el procesamiento del pre-ARNm.

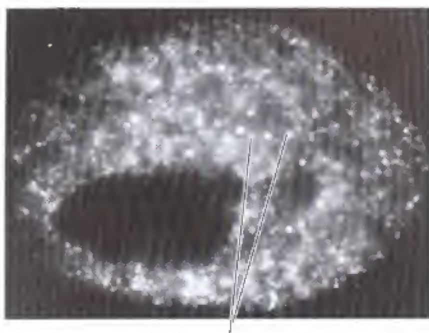



*Figura 8.19*
**Lugares agrupados de replicación de ADN.** El ADN recién replicado se marcó tras una exposición breve de las células a bromodeoxiuridina, que se incorpora al ADN en lugar de la timidina. Esta sustitución permite detectar el ADN recién sintetizado por inmunofluorescencia tras el marcaje de los núcleos con un anticuerpo contra bromodeoxiuridina. Obsérvese que el ADN recién replicado se localiza en agrupaciones distribuidas por todo el núcleo. (Cortesía de Ronald Berezny, SUNY/Buffalo.)

Aparte del moteado, los núcleos contienen otros tipos de estructuras o dominios estructuralmente diferentes. Los tres tipos principales de estos dominios nucleares son los nucléolos (estudiados más adelante), los cuerpos de Cajal o enrollados (Fig. 8.21) y los cuerpos PML. Los cuerpos de Cajal o enrollados están enriquecidos en pequeñas RNPs y se cree que funcionan como sitios de ensamblaje de RNPs. La función de los cuerpos PML es desconocida; no se encuentran enriquecidos en RNPs y no son sitios de replicación ni transcripción de ADN. Así, aunque estos cuerpos nucleares muestran la presencia de dominios subestructurales en el interior nuclear, sus funciones permanecen sin aclarar.

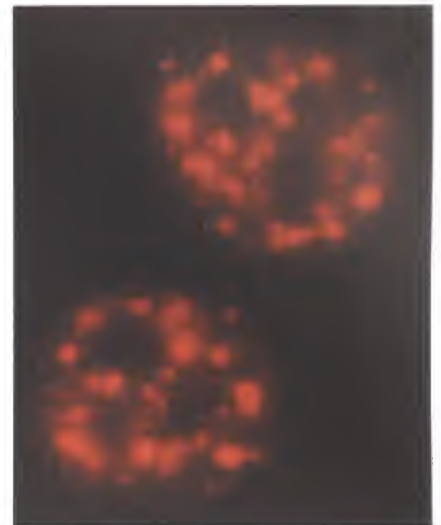


*Figura 8.20*
**Localización de los componentes responsables del *splicing*.** El marcaje mediante anticuerpos inmunofluorescentes indica que los factores responsables del *splicing* se concentran en dominios discretos dentro del núcleo. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

## Nucléolo

La subestructura que más destaca en el núcleo es el **nucléolo** (véase Fig. 8.1), que es el sitio donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del ARNr, y el ensamblaje de los ribosomas. Como se explicó en el capítulo anterior, las células necesitan una gran cantidad de ribosomas para satisfacer la necesidad de síntesis de proteínas. Por ejemplo, las células de mamífero en continuo crecimiento contienen entre 5 y 10 millones de ribosomas, que deben sintetizarse cada vez que la célula se divide. El nucléolo es una fábrica de producción de ribosomas, diseñada para cubrir las necesidades de producción a gran escala de los ARNr y de ensamblaje de las subunidades ribosómicas. Evidencias recientes sugieren que los nucléolos también poseen un papel más general en la modificación del ARN y que varios tipos de ARN entran y salen del nucléolo en estadios específicos de su procesamiento.

### *Genes de ARN ribosómico y organización del nucléolo*

El nucléolo no está rodeado por ningún sistema de membranas y se organiza alrededor de las regiones de los cromosomas que contienen los genes para los ARNr 5,8S, 18S y 28S. Los ribosomas eucariotas contienen cuatro tipos de ARN, denominados 5S, 5,8S, 18S y 28S (véase Fig. 7.4). Los ARNr 5,8S, 18S y 28S son transcritos como una única unidad en el nucléolo por la ARN polimerasa I, dando lugar a un ARN precursor ribosómico 45S (Fig. 8.22). Este pre-ARNr 45S es procesado y da lugar al ARN 18S de la subunidad ribosómica 40S (pequeña) y a los ARNr 5,8S y 28S de la subunidad ribosómica 60S (grande). El ARNr 5S, que también forma parte de la subunidad ribosómica 60S, se transcribe fuera del nucléolo por la ARN polimerasa III.

Las células contienen múltiples copias de los genes de ARNr para poder satisfacer la demanda de transcripción de un elevado número de moléculas de ARNr. El genoma humano por ejemplo, contiene aproximadamente unas 200 copias del gen que codifica para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, y aproximadamente 2.000 copias del gen que codifica para el ARNr 5S. Los genes del ARNr 5,8S, 18S y 28S se disponen en tándem en cinco cromosomas humanos diferentes

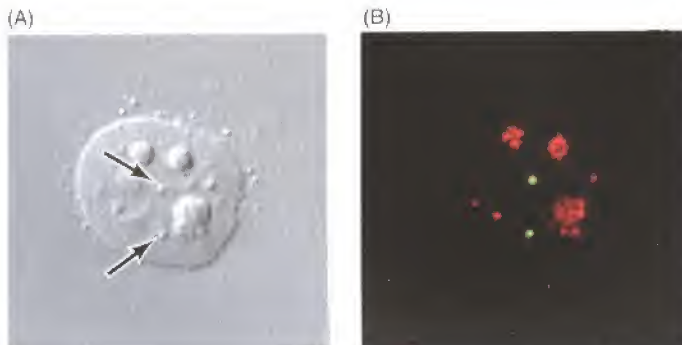



*Figura 8.21*
**Cuerpos de Cajal en el núcleo.** (A) Imagen de un microscopio de contraste por interferencia diferencial del núcleo de una célula HeLa. Las flechas indican los dos cuerpos de Cajal. (B) Tinción inmunofluorescente del mismo núcleo con anticuerpos frente a las proteínas Coilina (verde) y Fibrilarina (rojo). La fibrilarina está presente tanto en las zonas fibrilares densas de los nucleolos, como en los cuerpos de Cajal. La coilina sólo es detectable en los cuerpos de Cajal. (De J. G. Gall, 2000. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:273.)



## Medicina molecular

# Enfermedades de la lámina nuclear

### Las enfermedades

En 1966, Emery y Dreifuss describieron una nueva distrofia muscular ligada al cromosoma X. En estadíos tempranos de la enfermedad, los codos, cuello y talones de los individuos afectados se vuelven rígidos, y a menudo se produce un bloqueo de la conducción en el corazón. Estos síntomas aparecen antes de los 10 años de edad e incluyen «andar de puntillas» debido a rigidez de los tendones de Aquiles, y dificultad para doblar los codos. A los 20 años de edad han aparecido problemas cardíacos y puede ser necesario un marcapasos. Se produce una debilidad y degeneración gradual de los músculos del hombro y brazo superior y de los músculos de la pantorrilla, pero esto tiene lugar lentamente y a menudo no supone un problema hasta tarde en la vida.

Casi 30 años más tarde, los investigadores demostraron que mutaciones en una nueva proteína transmembrana eran responsables de esta distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Denominaron a la proteína emerina, en honor a Alan Emery. Poco después, varios grupos encontraron que la emerina era una proteína localizada en la membrana nuclear interna y ausente en pacientes con la distrofia muscular ligada al cromosoma X de Emery-Dreifuss. Esto era inesperado; las mutaciones en una proteína de la envuelta nuclear expresada en todas las células, aparentemente causaba una enfermedad específica de tejido. Mientras que todas las células del cuerpo carecían de la proteína, la patología sólo se producía en el músculo. Investigadores posteriores encontraron que la misma distrofia también podía heredarse de una forma no ligada al sexo. Familias con esta distrofia muscular de Emery-Dreifuss no ligada al sexo, poseían mutaciones en *LMNA*, el gen único que codifica las láminas A y C. Así, mutaciones en dos genes, uno que codifica una proteína de la membrana nuclear interna y otra que codifica una de las principales láminas nucleares, causaban una distrofia muscular clínicamente idéntica.

Más sorprendente fue que investigaciones paralelas sobre distintas enfermedades, la lipodistrofia parcial de tipo Dunnigan y el trastorno de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2B1, las situó en distintas mutaciones del gen *LMNA*. Anteriormente, los médicos clasificaban a estas enfermedades como distintas basándose en sus características clínicas y en su herencia. Trabajos recientes demuestran que las mutaciones de otra proteína de la membrana nuclear interna, el receptor para la lámina B, son la base para la Anomalía de Pelger-Huët.

### Base molecular y celular

La mayoría de los biólogos creían que las mutaciones en las láminas causarían defectos generalizados sobre la arquitectura nuclear y serios problemas en células que se dividen rápidamente. Sin embargo, sólo se producen aberraciones menores de la estructura nuclear en estos pacientes. Así, el misterio es cómo mutaciones en las láminas nucleares o proteínas de unión a las láminas, causan diferentes enfermedades tejido específicas. La respuesta todavía no se conoce pero existen dos hipótesis principales. La primera es la hipótesis de la «expresión génica». Esta defiende que la correcta interacción entre las dos proteínas láminas A y C, con la envuelta nuclear es esencial para la expresión normal y específica de tejido, de ciertos genes. Los genes transcripcionalmente inactivos se localizan preferentemente en la periferia nuclear, mientras que los genes expresados se concentran en el centro del núcleo con una especificidad dependiente del tipo celular. Así, la base de estas enfermedades sería un cambio en la expresión génica causada por interacciones proteicas defectuosas.

En la hipótesis del «estrés mecánico», se cree que las mutaciones en el complejo láminas-emerina debilitan la integridad estructural de una red citoesquelética integrada. En todas las células, la lámina, la membrana nuclear interna, y el complejo del poro nuclear están estrechamente relacionados. Esta hipótesis, que

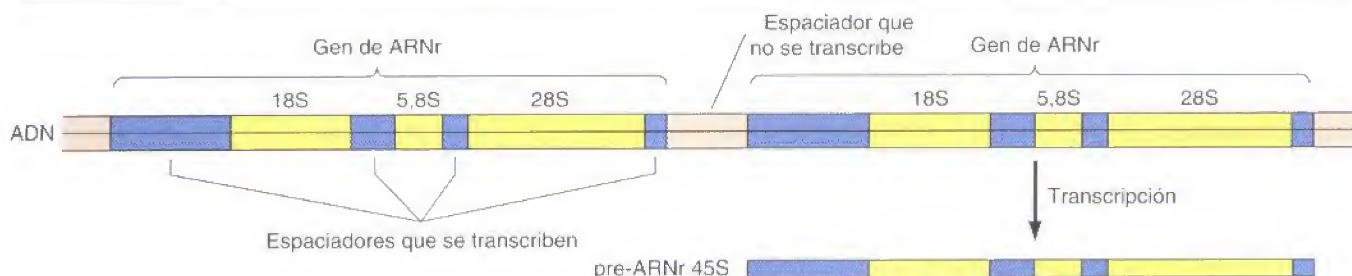



*Figura 8.22*
**Genes de ARN ribosómico.** Cada gen de ARNr es una única unidad transcripcional que contiene los ARNr 5,8S, 18S y 28S y secuencias espaciadoras que también se transcriben. Los genes de ARNr se disponen en tándem, separados por un ADN espaciador que no se transcribe.

## *Enfermedades de la lámina nuclear* (continuación)

funciona mejor para las distrofias musculares, sugiere que a través de filamentos adheridos al complejo del poro nuclear, la lámina podría conectarse indirectamente con el citoesqueleto de la célula muscular.

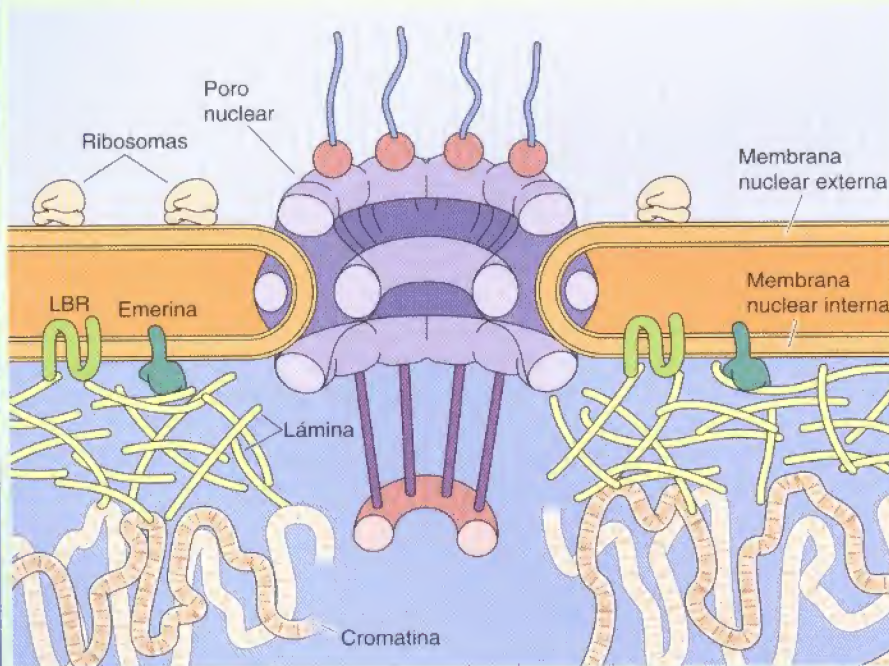
### Prevención y tratamiento

El descubrimiento de que las mutaciones en proteínas frecuentemente expresadas del complejo de la lámina nuclear, causan diferentes enfermedades hereditarias específicas de tejido, ha sido una sorpresa y ha modificado la forma en que los científicos consideran a la envuelta nuclear. Se requiere más investigación para conocer si la base de las patologías de cada una de estas enfermedades es la regulación mecánica o la expresión génica. Sin embargo, la naturaleza molecular conocida de las enfermedades, simplifica enormemente su diagnóstico y hace que su tratamiento sea más probable. El desarrollo reciente de un modelo de ratón en el que el gen *LMNA* está anulado representa un primer paso. A medida que se desarrollan los embriones, muestran síntomas de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Finalmente, los investigadores son actualmente conscientes de que varias enfermedades congénitas de desarrollo lento, pueden ser nuevos miembros de las «laminopatías» nucleares.

### Referencia

Ngano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y. K., T. Tsukahara y K. Arahata 1996. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 12: 254-259.

Worman, H. J. y J. C. Courvalin 2002. The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol.* 12: 591-598.




Envuelta nuclear y lámina nuclear de mamíferos. La membrana nuclear interna contiene varias proteínas integrales que interaccionan con las láminas nucleares. Las proteínas transmembrana emerina y el receptor para lámina B (LBR) son representativas. La lámina también interacciona con la cromatina.

(cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22); los genes para el ARNr 5S se localizan en una única secuencia en tándem en el cromosoma 1.

La importancia de la producción de ribosomas resulta particularmente evidente en los oocitos, en los que los genes para los ARNr están amplificados para ayudar a la síntesis de la gran cantidad de ribosomas necesarios durante el desarrollo embrionario temprano. En los oocitos de *Xenopus*, los genes para el ARNr están amplificados aproximadamente 2.000 veces, lo que permite que exitan un millón de copias por célula. Estos genes de ARNr están distribuidos

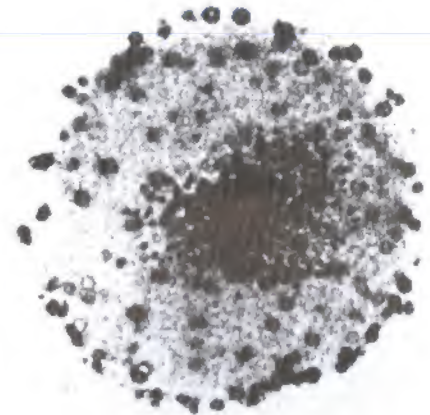


*Figura 8.23*
**Nucléolos en oocitos de anfibio.** Los genes de ARNr amplificados en los oocitos de *Xenopus* se agrupan en muchos nucléolos (puntos oscuros). (De D. D. Brown e I. B. Dawid, 1968. *Science* 160: 272.)

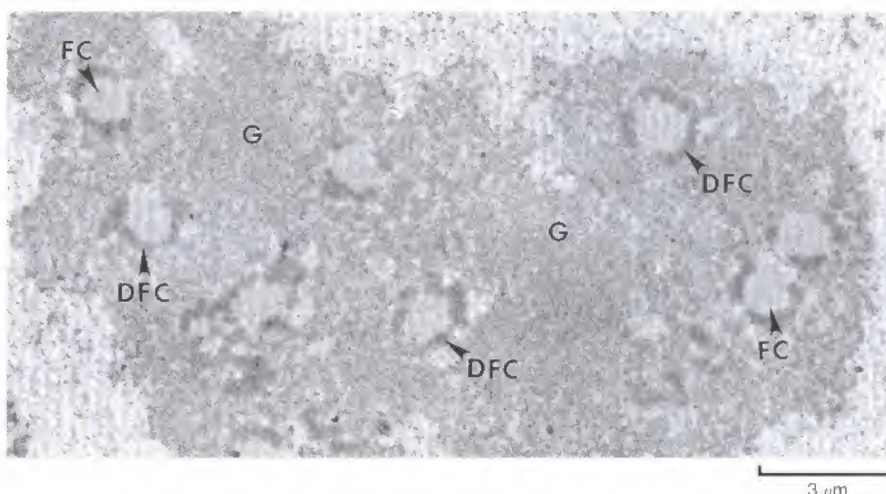



*Figura 8.24*
**Estructura del nucléolo.** En la micrografía electrónica se ilustra el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (G) del nucléolo. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

entre miles de nucléolos (Fig. 8.23), originándose en total cerca de $10^{12}$ ribosomas por oocito.

Morfológicamente, los nucléolos constan de tres regiones diferenciadas: el centro fibrilar, el componente fibrilar denso y el componente granular (Fig. 8.24). Estas tres zonas posiblemente reflejan la progresión de las etapas de transcripción del ARNr, procesamiento, y ensamblaje de ribosomas. La modificación de otros ARNs pequeños, como el de la partícula de reconocimiento de la señal (véase Capítulo 9), tiene lugar en otro lugar dentro del nucléolo.

Después de cada división celular, los nucléolos se forman alrededor de las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, y que por esta razón se denominan **regiones organizadoras nucleolares** (NOR). La formación de los nucléolos requiere la transcripción del pre-ARNr 45S, que parece ser que dirige la fusión de los cuerpos prenucleolares que contienen los factores implicados en el procesamiento y otros componentes del nucléolo. Por lo tanto, en la mayoría de las células, los nucléolos que están inicialmente separados se fusionan para formar un único nucléolo. El tamaño del nucléolo depende de la actividad metabólica de la célula, siendo los nucléolos más grandes en aquellas células con una alta actividad de síntesis de proteínas. Esta variación se debe fundamentalmente a las diferencias en el tamaño del componente granular, lo que refleja la tasa de ensamblaje de ribosomas.

### *Transcripción y procesamiento del ARNr*

Cada región de organización nuclear contiene un grupo de genes de ARNr repetidos en tándem y que están separados entre sí por regiones de ADN espaciador que no se transcribe. Estos genes son transcritos activamente por la ARN polimerasa I, lo que permite que la transcripción se pueda visualizar fácilmente por microscopía electrónica (Fig. 8.25). En las micrografías electrónicas, cada uno de los genes de ARNr colocados en tándem se encuentra rodeado de

*Figura 8.25*
**Transcripción de los genes de ARNr.** Una micrografía electrónica de la cromatina nuclear, mostrando tres genes de ARNr separados por ADN espaciador que no se transcribe. Cada gen de ARNr está rodeado por un conjunto de cadenas de ARNr en crecimiento, dando una apariencia en forma de «árbol de navidad». (Cortesía de O.L. Miller, Jr.)



cadenas de ARN en crecimiento densamente empaquetadas, dando lugar a una estructura en forma de «árbol de navidad». La alta densidad de las cadenas de ARN en crecimiento es debida a la gran cantidad de moléculas de ARN polimerasa, presentes en una densidad máxima de, aproximadamente, una polimerasa por cada cien pares de bases del ADN molde.

El transcrito primario de los genes de ARNr es el pre-ARNr 45S de gran tamaño, que contiene los ARNr 18S, 5,8S y 28S, además de las regiones espaciadoras transcritas (Fig. 8.26). Dos espaciadores externos que son transcritos se localizan en los extremos 5' y 3'de los pre-ARNr, y dos espaciadores internos se sitúan entre las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 28S. La etapa inicial del procesamiento es una escisión dentro del espaciador externo cerca del extremo 5' del pre-ARNr, que tiene lugar durante las etapas iniciales de la transcripción. Esta escisión necesita la RNP nucleolar pequeña U3 (véase posteriormente) que se une al extremo 5' del pre-ARNr, formando las características protuberancias que se observan en la Figura 8.25. Una vez finalizada la transcripción, se elimina el espaciador del extremo 3' de la molécula. En las células humanas, tras esta etapa se produce una escisión en el extremo 5' de la región 5,8S originando dos precursores, uno del ARNr 18S y otro que contiene el 5,8S y el 28S. Escisiones posteriores originan los ARNr maduros. Este procesamiento sigue un modelo similar en otras especies, aunque hay ciertas diferencias en el orden de algunas escisiones.

Además de las escisiones, el procesamiento del pre-ARNr implica importantes modificaciones en las bases nitrogenadas, debido a la adición de grupos metilo a algunas bases concretas y a residuos de ribosa, y por la conversión de uridina en pseudouridina (véase Fig. 6.40). En las células animales, el procesamiento del pre-ARNr implica la metilación de aproximadamente cien restos de ribosa y 10 bases, además de la formación de cerca de cien pseudouridinas. La mayoría de estas modificaciones ocurre durante o inmediatamente después de la síntesis del pre-ARNr, aunque algunas tienen lugar en etapas posteriores del procesamiento del pre-ARNr.

El procesamiento del pre-ARNr requiere la intervención de proteínas y ARNs localizados en el nucléolo. La participación de ARNs nucleares pequeños (ARNsn) en el procesamiento del pre-ARNm ya se explicó en el Capítulo 6. Los nucléolos contienen más de 300 proteínas y un gran número (aproximadamente

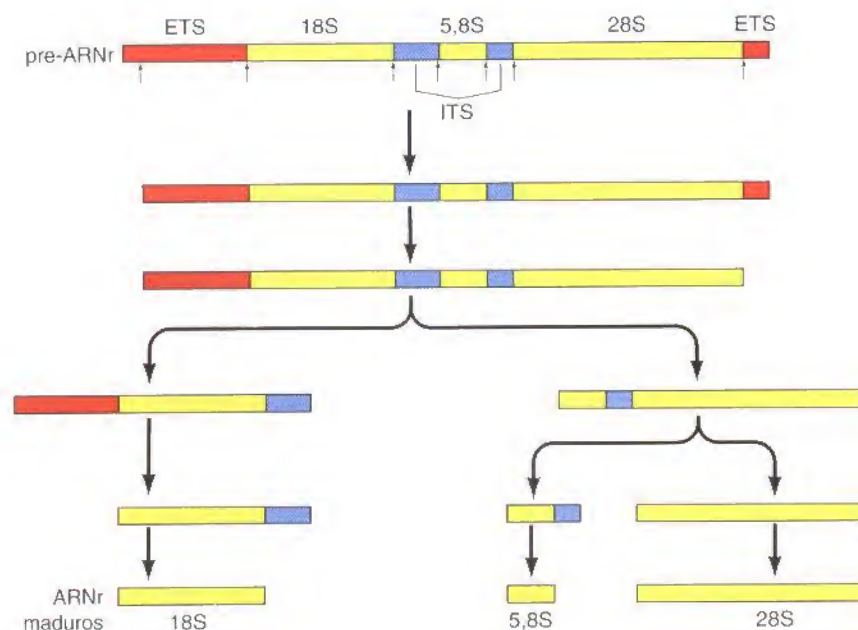


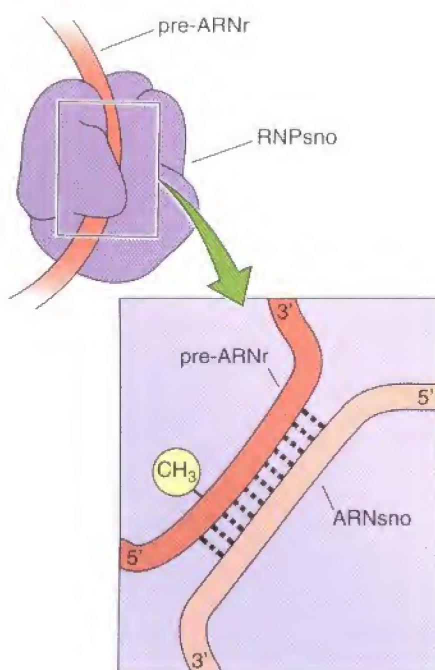

*Figura 8.26*
**Procesamiento del pre-ARNr.** El transcrito pre-ARNr 45S contiene espaciadores transcritos externos (ETS) en ambos extremos, y espaciadores transcritos internos (ITS) entre las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 28S. El pre-ARNr es procesado mediante una serie de escisiones (que se muestran en el caso de un pre-ARNr humano) para originar los ARNr maduros.

200) de **ARNs nucleolares pequeños (ARNsno)** que intervienen en el procesamiento del pre-ARNr. Al igual que los ARNsn de los espliceosomas, los ARNsno están unidos a proteínas, formando RNPsno. Cada RNPsno está constituida por un único ARNsno asociado a ocho o diez proteínas. Las RNPsno se unen al pre-ARNr para formar un complejo de procesamiento de manera análoga a como se forman los espliceosomas en el pre-ARNm.

Algunos ARNsno son los responsables de la fragmentación del pre-ARNr en productos 18S, 5,8S y 28S. Por ejemplo, el ARNsno nucleolar más abundante es el U3 y está presente en unas 200.000 copias por célula. Como ya se ha dicho, U3 es necesario para la escisión inicial del pre-ARNr que se produce en las regiones espaciadoras transcritas del extremo 5'. De manera similar, el ARNsno U8 provoca la escisión del pre-ARNr en ARNr 5,8S y 28S y el ARNsno U22 es responsable de la fragmentación del pre-ARNr para dar lugar al ARNr 18S.

Sin embargo, la función de la mayoría de los ARNsno es dirigir las modificaciones de bases específicas del pre-ARNr, incluyendo la metilación de residuos específicos de ribosa y la formación de pseudouridinas (Fig. 8.27). La mayoría de los ARNsno contienen secuencias cortas de, aproximadamente, 15 nucleótidos que son complementarias a secuencias de los ARNr 18S y 28S. Estas regiones complementarias incluyen los sitios de modificación de bases en el ARNr. Mediante el apareamiento de bases con regiones específicas del pre-ARNr, los ARNsno actúan como ARNs guías que dirigen a las enzimas que catalizan la metilación de las ribosas o la conversión de uridina en pseudouridina, al sitio adecuado de la molécula de pre-ARNr. Otros ARNs aparte del ARNr requieren bases modificadas y se cree que es la localización de RNPsno en el nucléolo lo que es fundamental en su papel más general en la modificación del ARN. Un ejemplo es el ARN de la partícula de reconocimiento de la señal (véase Capítulo 9).

*Figura 8.27*
**Papel de los ARNsno en la modificación de las bases del pre-ARNr.** Los ARNsno contienen pequeñas secuencias complementarias al ARNr. El apareamiento de bases entre los ARNsno y el pre-ARNr dirige a las enzimas que catalizan la modificación de bases (p. ej., metilación) a los sitios apropiados del pre-ARNr.




## *Ensamblaje de ribosomas*

La formación de los ribosomas implica el ensamblaje del ARN ribosómico precursor con las proteínas ribosómicas y con el ARNr 5S (Fig. 8.28). Los genes que codifican para las proteínas ribosómicas se transcriben fuera del nucléolo por la ARN polimerasa II, originando ARNm que son traducidos en los ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas ribosómicas se transportan posteriormente desde el citoplasma al nucléolo, donde se ensamblan con los ARNr para formar partículas prerribosómicas. Aunque los genes para el ARNr 5S también se transcriben fuera del nucléolo, en este caso por la ARN polimerasa III, se ensamblan igualmente en el interior del nucléolo para formar las partículas prerribosómicas.

La asociación de las proteínas ribosómicas con el ARNr comienza mientras ocurre la síntesis del ARNr, y más de la mitad de las proteínas ribosómicas están unidas al pre-ARNr antes de su procesamiento. Las restantes proteínas ribosómicas y el ARNr 5S se incorporan a las partículas prerribosómicas mientras tiene lugar la escisión del pre-ARNr. Durante la primera etapa de la asociación ribosómica, la maduración de las dos subunidades ribosómicas emergentes se diferencia. La maduración de la unidad más pequeña, que sólo contiene ARNr 18S, es más sencilla e implica únicamente cuatro escisiones de la endonucleasa. La escisión final que resulta en la ARNr 18S madura normalmente se produce tras el transporte de la subunidad 40S al citosol. La maduración de la unidad mayor, que contiene 28S, 5,5S y ARNr 5S, implica múltiples escisiones del núcleo y se completa dentro del nucléolo. Por lo tanto, la mayoría de las partículas prerribosómicas del nucléolo son precursores de las subunidades grandes (60S). Las etapas finales de la maduración de los ribosomas siguen a la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, formando las subunidades ribosómicas eucariotas 40S y 60S.

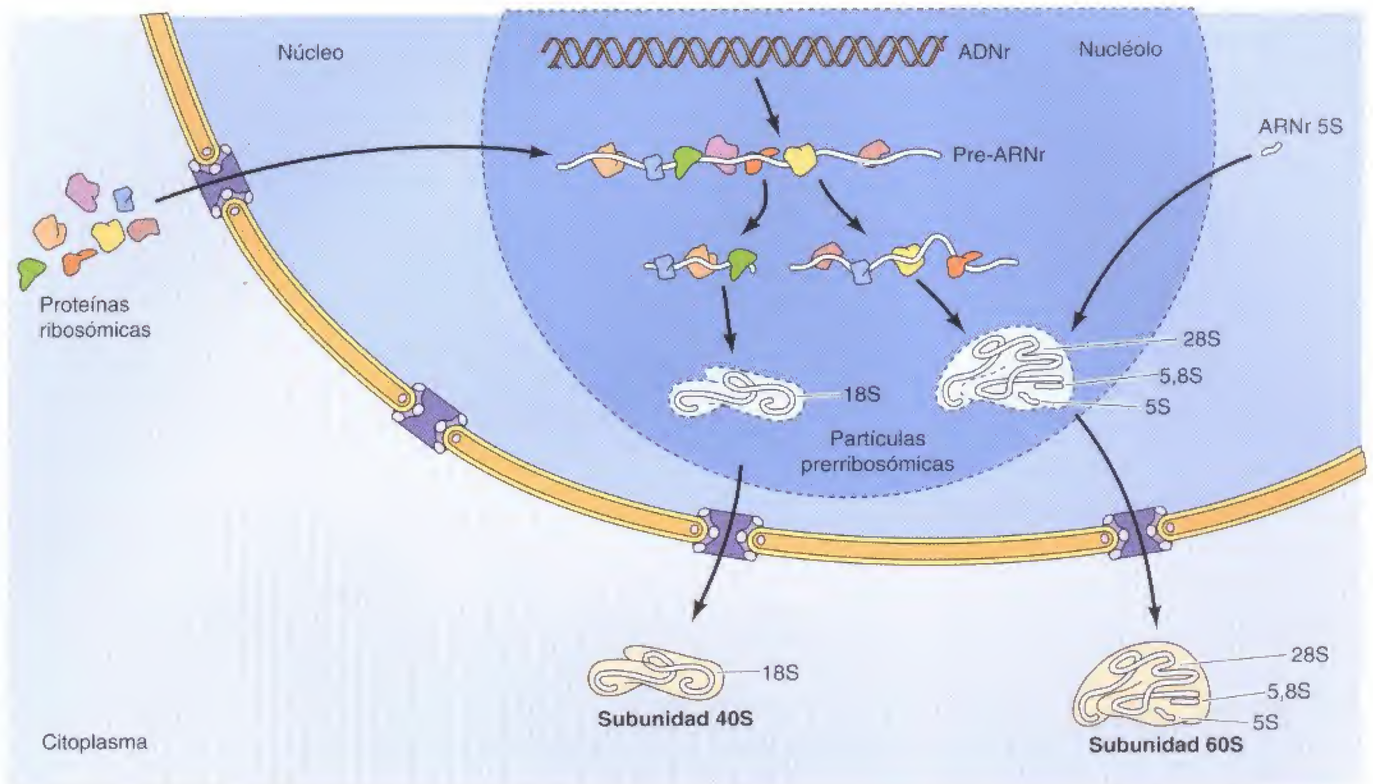



*Figura 8.28*
**Ensamblaje de los ribosomas.** Las proteínas ribosómicas se transportan al nucléolo desde el citoplasma y comienzan a ensamblarse con el pre-ARNr antes de su procesamiento. Al mismo tiempo que se procesa el pre-ARNr, proteínas ribosómicas adicionales y el ARNr 5S (que es sintetizado fuera del nucléolo) se ensamblan para formar partículas prerribosómicas. Las etapas finales de la maduración continúan con la salida de las partículas prerribosómicas al citoplasma, originando las subunidades ribosómicas 40S y 60S.

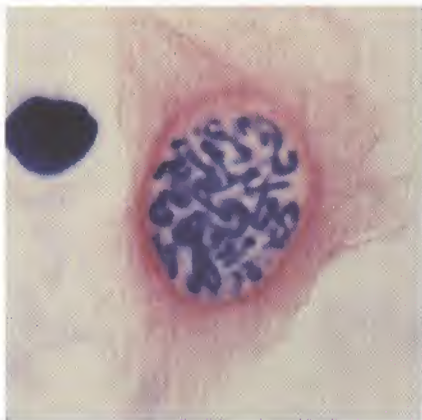
## El núcleo durante la mitosis

Una característica del núcleo es que se desensambla y se reorganiza cada vez que la célula se divide. Al principio de la mitosis, los cromosomas se condensan, el nucléolo desaparece y la envuelta nuclear se disgrega, lo que da lugar a la liberación del contenido nuclear en el citoplasma. Al final de la mitosis tiene lugar el proceso inverso: los cromosomas se descondensan y la envuelta nuclear se organiza alrededor de cada juego de cromosomas hijos. En el Capítulo 14 se explica de manera extensa el proceso de la mitosis; en este apartado se considerarán los mecanismos implicados en el desensamblaje y reorganización del núcleo. El proceso es controlado principalmente mediante fosforilaciones y desfosforilaciones reversibles de las proteínas nucleares, debido a la acción de la proteína quinasa **Cdc2**, que es un regulador fundamental de la mitosis en las células eucariotas.

### *Disgregación de la envuelta nuclear*

En la mayoría de las células, la disgregación de la envuelta nuclear marca el final de la profase de la mitosis (Fig. 8.29). Sin embargo, el desensamblaje del núcleo no es una característica universal de la mitosis y no ocurre en todas las células. Algunos organismos eucariotas unicelulares (p. ej., levaduras) sufren la denominada mitosis cerrada, en la que la envuelta nuclear permanece intacta (Fig. 8.30). En la mitosis cerrada, los cromosomas hijos migran a polos opuestos del núcleo, que entonces se divide en dos. Las células de los organismos eucariotas superiores, sin embargo, normalmente sufren la mitosis abierta, que se caracteriza por la rotura de la envuelta nuclear. Los cromosomas hijos entonces migran a los polos opuestos del huso mitótico y los nuevos núcleos se reorganizan a su alrededor.

Profase



Prometafase

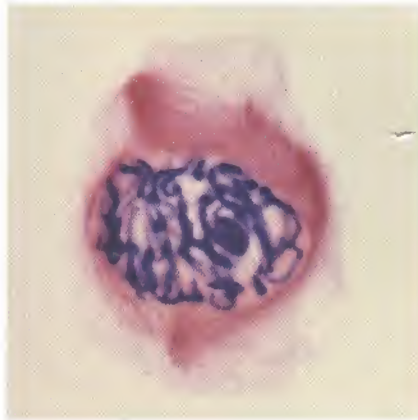


*Figura 8.29*
**El núcleo durante la mitosis.** Las micrografías ilustran las etapas sucesivas de la mitosis en una célula vegetal. Durante la profase, los cromosomas se condensan, el núcleo desaparece y la envuelta nuclear se disgrega. En la metafase, los cromosomas condensados se alinean en el centro del huso mitótico. Entonces los cromosomas hijos se dirigen hacia los polos del huso (anafase), y durante la telofase los cromosomas se descondensan y el núcleo se reorganiza. Los cromosomas aparecen en azul y los microtúbulos del huso en rojo. (Cortesía de Andrex S. Bajer, University of Oregon.)

Metafase

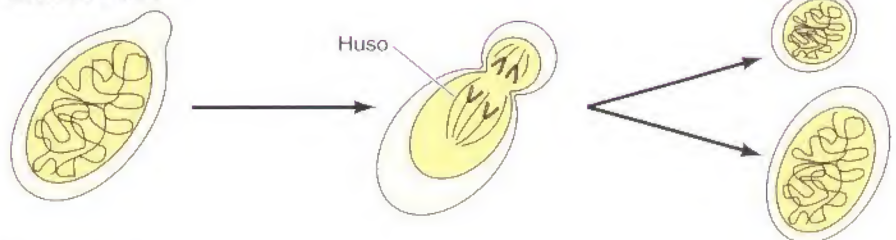


Anafase



Telofase





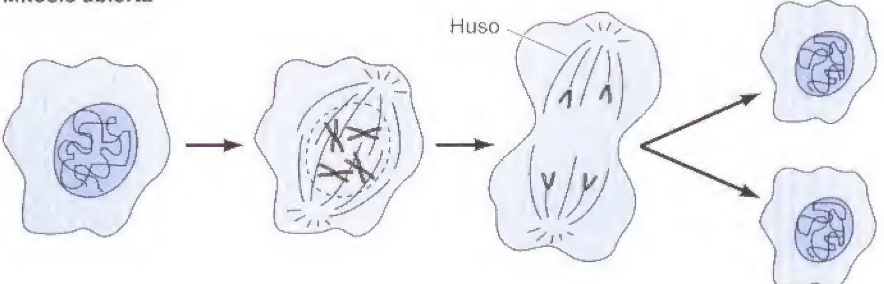
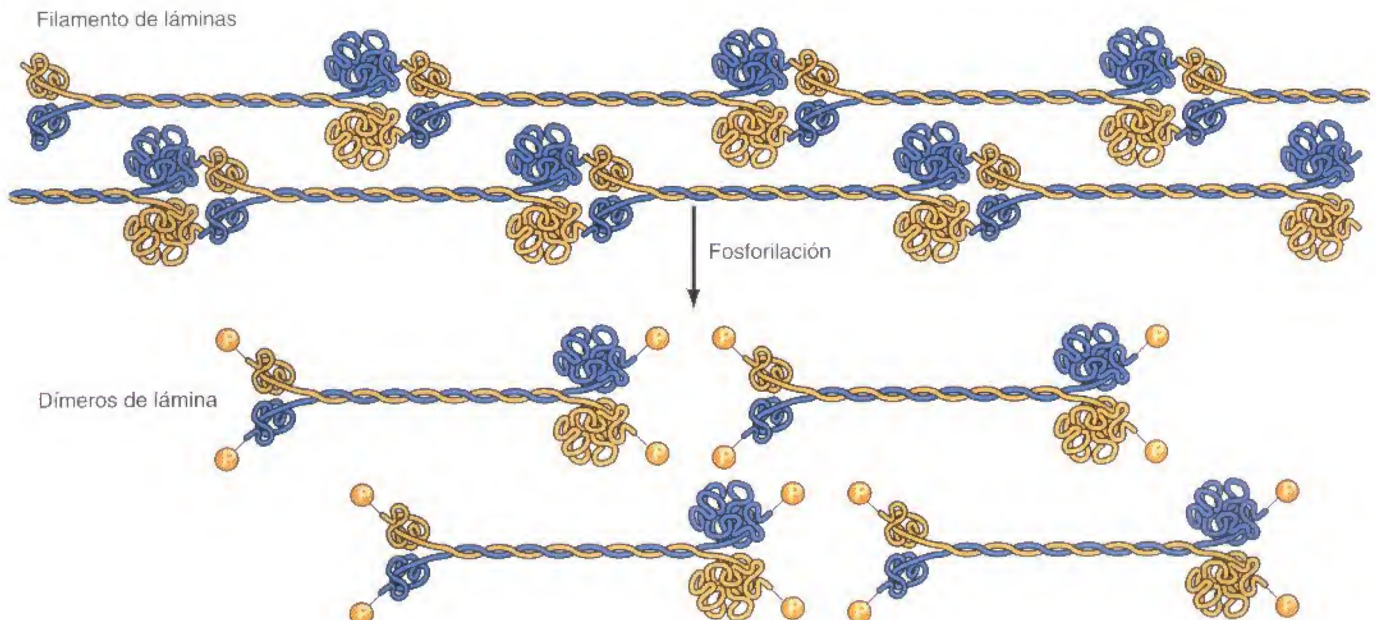




*Figura 8.30*
**Mitosis cerrada y abierta.** En la mitosis cerrada, la envuelta nuclear permanece intacta y los cromosomas migran a los polos opuestos del huso dentro del núcleo. En la mitosis abierta, la envuelta nuclear se disgrega primero y reorganiza después alrededor de los dos juegos separados de cromosomas.

La disgregación de la envuelta nuclear, que ocurre a la vez que la fragmentación del retículo endoplásmico, implica cambios en sus tres componentes: las membranas nucleares se fragmentan en vesículas, los complejos del poro nuclear se disocian, y la lámina nuclear se despolimeriza. De estos tres, el suceso mejor conocido es la despolimerización de la lámina nuclear —la malla de filamentos debajo de la membrana nuclear—. La lámina nuclear está compuesta por proteína fibrosas, las láminas, que se asocian entre sí formando filamentos. El desensamblaje de la lámina nuclear se debe a la fosforilación de las láminas, que provoca la escisión de los filamentos en dímeros de lámina (Fig. 8.31). La fosforilación de las láminas está catalizada por la proteína quinasa Cdc2, ya mencionada en el Capítulo 7 (véase Fig. 7.40), y cuyo papel como regulador central de la mitosis se explicará en el Capítulo 14. Cdc2 (al igual que otras proteína quinasas activadas en las células en mitosis) fosforila los distintos tipos de láminas; se ha demostrado que el tratamiento con Cdc2 de núcleos aislados era suficiente para inducir la despolimerización de la lámina nuclear. El que la fosforilación de las láminas sea necesaria para la rotura de la lámina nuclear se ha demostrado de manera directa usando láminas mutadas que no pueden ser fosforiladas. Cuando los genes que codifican estas láminas mutadas son introducidos en las células, su expresión bloquea el desensamblaje normal de la lámina nuclear cuando las células entran en mitosis.

A la vez que ocurre el desensamblaje de la lámina nuclear, la envuelta nuclear se fragmenta en vesículas (Fig. 8.32). Las láminas tipo B permanecen asociadas a estas vesículas, pero las láminas A y C se disocian de la membrana nuclear y se liberan como dímeros libres al citosol. Esta diferencia se debe a que las láminas B se encuentran permanentemente modificadas por la adición de lípidos (grupos prenilo), mientras que los grupos prenilo carboxilo terminales de las láminas A y C se eliminan por proteolisis tras su incorporación a la lámina. Los complejos del poro nuclear también se disocian en subunidades como resultado de la fosforilación de algunas proteínas del poro nuclear. Las proteínas integrales de la membrana nuclear también son fosforiladas durante la mitosis, y esta fosforilación puede ser importante en la formación de vesículas así como en la disociación de la membrana nuclear de los cromosomas y de la lámina nuclear.

*Figura 8.31*
**Desensamblaje de la lámina nuclear.** La lámina nuclear es una malla de filamentos de lámina. En la mitosis, Cdc2 y otras proteína quinasas fosforilan las láminas, causando que los filamentos se disocien en dímeros de lámina libres.



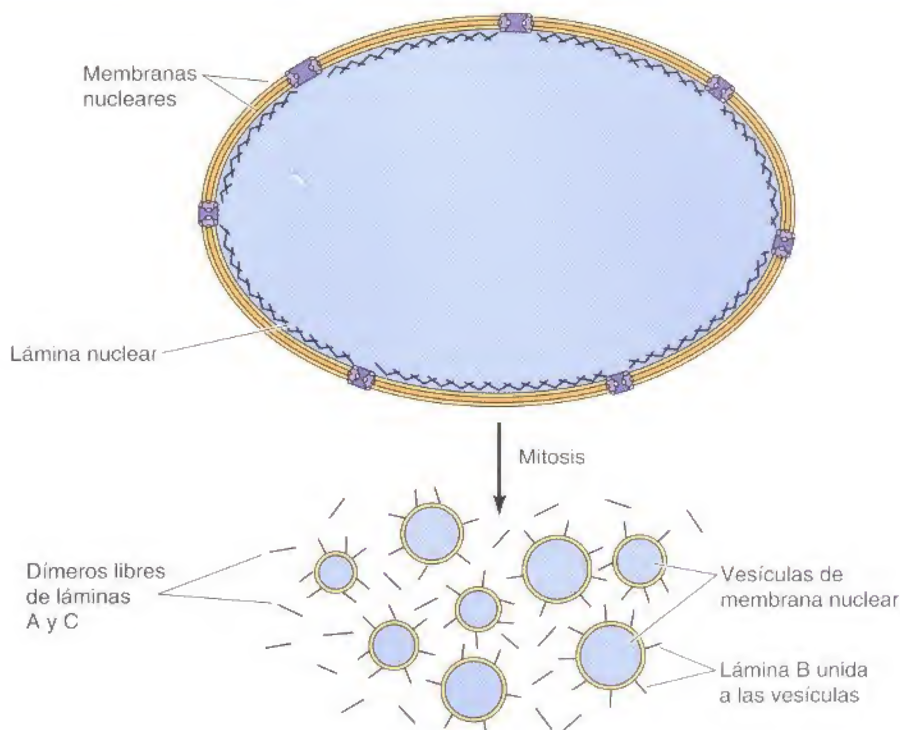
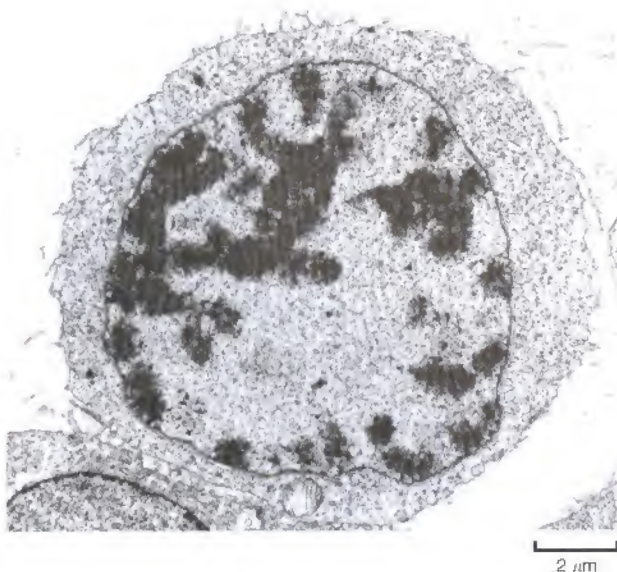



*Figura 8.32*
**Fragmentación de la membrana nuclear.** Cuando la lámina nuclear se disocia, la membrana nuclear se fragmenta en vesículas. Las láminas tipo B permanecen unidas a estas vesículas, mientras que las láminas A y C se liberan formando dímeros.

## *Condensación de los cromosomas*

El otro cambio fundamental en la estructura del núcleo durante la mitosis es la condensación de los cromosomas. La cromatina interfásica, que se encuentra organizada en los nucleosomas, se condensa aproximadamente mil veces más para formar los cromosomas compactos que se observan en las células mitóticas (Fig. 8.33). Esta condensación es necesaria para que los cromosomas se muevan a lo largo del huso mitótico sin enredarse o romperse durante su segregación a las células hijas. El ADN en este estado altamente condensado ya no puede ser transcrito, por lo que durante la mitosis cesa toda la síntesis del ARN. A medida que los cromosomas se condensan y la transcripción termina, los nucléolos desaparecen.

*Figura 8.33*
**Condensación de los cromosomas.** Micrografía electrónica que muestra la condensación de los cromosomas individuales durante la profase de la mitosis. (K.G. Murti/Visuals Unlimited.)




El ADN condensado en los cromosomas metafásicos parece que se organiza en grandes bucles, cada uno de ellos formado por, aproximadamente, 100 kilobases de ADN, unidos a un «andamio» de proteínas (véase Fig. 4.13). A pesar de su importancia fundamental, el mecanismo de condensación cromosómica durante la mitosis todavía no se conoce. La unidad básica estructural de la cromatina es el nucleosoma, constituido por 146 pares de bases dispuestos alrededor de un núcleo de proteínas histónicas compuesto por dos moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4 (véase Fig. 4.8). A medida que el ADN se integra en el núcleo del nucleosoma, se le une una molécula de histona H1, y la interacción entre las histonas H1 es la responsable del plegamiento de la cromatina en una estructura de orden superior, más compacta. La histona H1 es un sustrato de la proteína quinasa Cdc2 y se fosforila durante la mitosis en la mayoría de las células, lo que concuerda

con el papel que desempeña esta fosforilación en la condensación de los cromosomas mitóticos. Sin embargo, experimentos recientes han demostrado que la fosforilación de la histona H1 no es necesaria para la condensación de los cromosomas, por lo que el papel de la fosforilación de la histona H1 no está claro. Sin embargo, se ha visto que la fosforilación de la histona H3 sí que es necesaria para la condensación de los cromosomas mitóticos, aunque el mecanismo por el que esta fosforilación afecta a la condensación cromosómica todavía no se ha determinado.

En estudios recientes, se ha identificado un complejo de cinco proteínas denominado condensina, que se encuentra muy conservado en eucariotas. El complejo contiene dos subunidades estructurales, que forman parte de una clase superior de proteínas «de mantenimiento estructural del cromosoma» (SMC) y tres subunidades reguladoras. El complejo juega un papel fundamental en la organización del cromosoma normal durante la interfase, además de en la mayor condensación que tiene lugar durante la mitosis. Algunas de las subunidades reguladoras son fosforiladas por quinasas, entre ellas la quinasa Cdc2, y esto puede funcionar como un enlace con modificaciones de la condensación cromosómica durante la mitosis. Es interesante que un complejo similar, denominado cohesina, juega un papel en el emparejamiento de cromátidas hermanas durante la metafase.

### *Reorganización del núcleo interfásico*

En la última fase de la mitosis (telofase), se forman dos nuevos núcleos alrededor de cada juego separado de cromosomas hijos (véase Fig. 8.29). La descondensación de los cromosomas y la reorganización de la envuelta nuclear parece ser que ocurren por la inactivación de Cdc2, que es responsable de la entrada en mitosis mediante la fosforilación de las proteínas diana, que incluyen las láminas, la histona H3 y las condensinas. La progresión de metafase a anafase implica la activación de un sistema de proteolisis mediada por ubiquitina que inactiva la Cdc2, degradando su subunidad reguladora, la ciclina B (véase Fig. 7.40). La inactivación de Cdc2 provoca la desfosforilación de las proteínas que fueron fosforiladas al inicio de la mitosis, lo que induce la salida de la mitosis y la reorganización del núcleo interfásico.

La etapa inicial de la reorganización de la envuelta nuclear es la unión de las vesículas, que se formaron durante la fragmentación de la membrana nuclear, a la superficie de los cromosomas (Fig. 8.34). Esta interacción entre las vesículas de membrana con los cromosomas puede que se produzca tanto a través de las láminas, como a través de las proteínas integrales de la membrana nuclear interna. Las vesículas entonces se fusionan para formar una doble membrana alrededor de los cromosomas. Posteriormente, se produce el reensamblaje de los complejos del poro nuclear, la reorganización de la lámina nuclear y la descondensación de los cromosomas. Inicialmente, las vesículas se fusionan para formar las membranas alrededor de los cromosomas individuales, y luego se fusionan unos con otros para dar lugar a un único núcleo completo.

La reorganización de la envuelta nuclear alrededor de los cromosomas condensados excluye a las moléculas citoplasmáticas de los nuevos núcleos ensamblados. El nuevo núcleo es capaz de expandirse mediante el transporte selectivo de proteínas nucleares desde el citoplasma. Debido a que las señales de localización nuclear no se eliminan de las proteínas que se importan al núcleo, estas mismas proteínas nucleares que fueron liberadas al citoplasma tras el desensamblaje de la envuelta nuclear al principio de la mitosis, son de nuevo reimportadas a los nuevos núcleos después de la mitosis. La proteína Ran está implicada en muchos de los pasos tempranos de la reformación del núcleo. Los nucléolos también reaparecen a medida que los cromosomas se descondensan y comienza la transcripción de los genes de ARNr, lo que completa el paso de la mitosis a un núcleo interfásico.

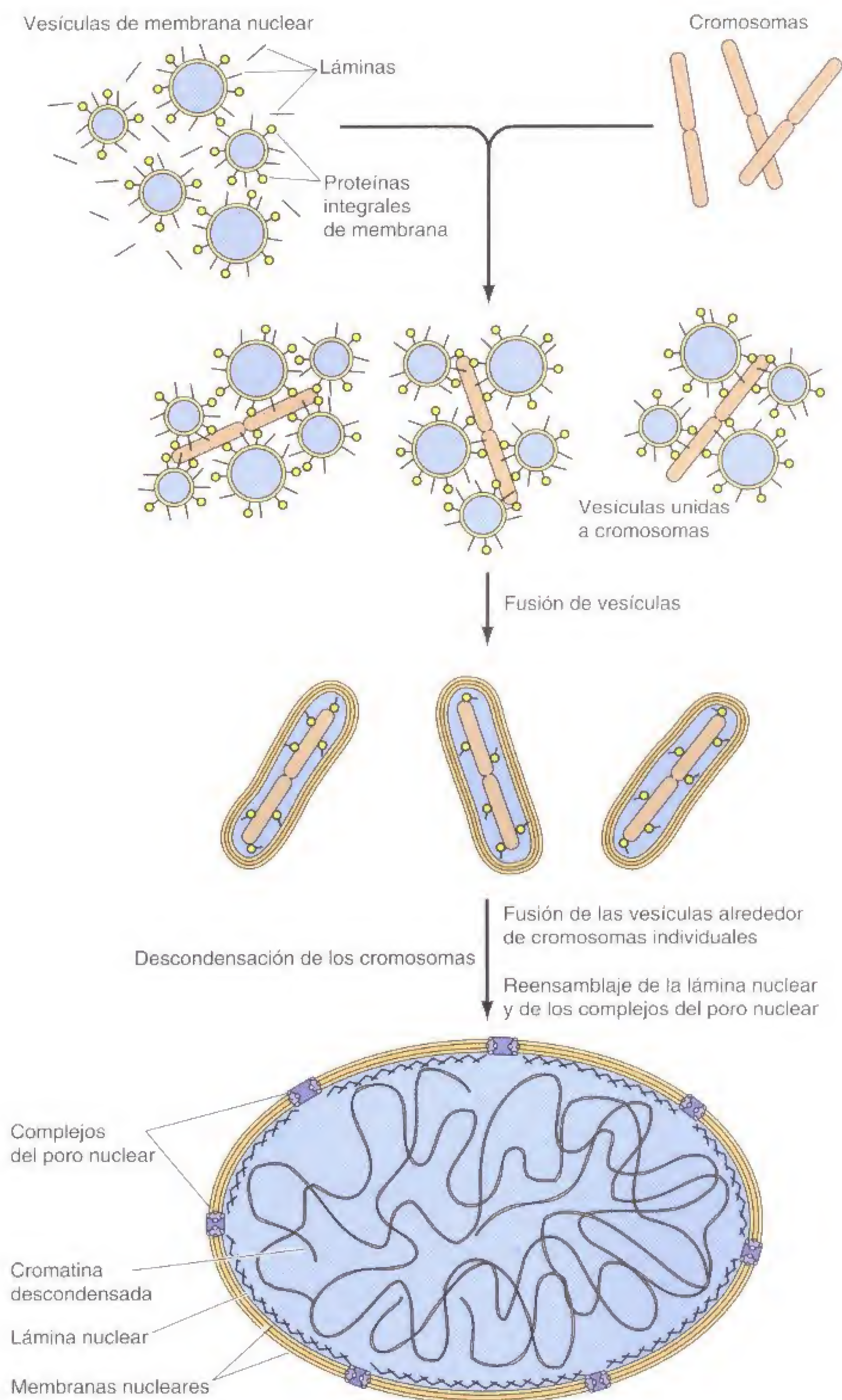



*Figura 8.34*
**Reorganización de la envuelta nuclear.** La primera etapa del reensamblaje de la envuelta nuclear es la unión de las vesículas de membrana a los cromosomas, a través de las proteínas integrales de membrana y de las láminas tipo B. Entonces las vesículas se fusionan, la lámina nuclear se reorganiza y los cromosomas se descondensan.

## RESUMEN

### ENVUELTA NUCLEAR Y TRÁFICO ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA

***Estructura de la envuelta nuclear:*** La envuelta nuclear separa el contenido del núcleo y del citoplasma, manteniendo el núcleo como un compartimento bioquímico diferenciado que alberga el material genético y sirve como lugar de transcripción y procesamiento del ARN en las células eucariotas. La envuelta nuclear está formada por una membrana nuclear interna y externa, unidas a nivel de los complejos del poro nuclear, y por una lámina nuclear subyacente.

**envuelta nuclear, membrana nuclear, lámina nuclear, lámina**

***Complejo del poro nuclear:*** Los complejos del poro nuclear son estructuras grandes y son las únicas vías a través de las cuales las moléculas pueden viajar entre el núcleo y el citoplasma. Las moléculas pequeñas son capaces de difundir libremente a través de los canales abiertos del complejo del poro nuclear. Las macromoléculas se transportan selectivamente en un proceso dependiente de energía.

**complejo del poro nuclear**

***Transporte selectivo de proteínas desde y hacia el núcleo:*** Las proteínas que van a ser transportadas al núcleo contienen señales de localización nuclear que son reconocidas por receptores que dirigen el transporte a través del complejo del poro nuclear. Las proteínas que se desplazan continuamente entre el núcleo y el citoplasma tienen señales de exportación nuclear que las etiquetan para que sean transportadas desde el núcleo al citoplasma. La pequeña proteína Ran, que une GTP, se necesita para la translocación a través del complejo del poro nuclear y determina la dirección del transporte.

**señal de localización nuclear, importina, Ran, cariofenina, señal de exportación nuclear, exportina,**

***Regulación del transporte de proteínas al núcleo y desde el núcleo:*** La actividad de ciertas proteínas, como los factores de transcripción, está controlada por la regulación tanto de su entrada, como de su salida desde el núcleo.

***Transporte de ARNs:*** Los ARNs se transportan a través del complejo del poro nuclear en forma de complejos ribonucleoproteínicos. Los ARNs mensajeros, los ARNs ribosómicos y los ARNs de transferencia son exportados desde el núcleo para participar en la síntesis de proteínas. Los ARNs nucleares pequeños son transportados inicialmente desde el núcleo al citoplasma, donde se asocian con proteínas para formar las RNPsn, y éstas regresan al núcleo.

### ORGANIZACIÓN INTERNA DEL NÚCLEO

***Cromosomas y estructura de orden superior de la cromatina:*** El núcleo interfásico contiene heterocromatina altamente condensada, transcripcionalmente inactiva, así como eucromatina descondensada. Los cromosomas interfásicos se organizan en el núcleo y se estructuran en grandes dominios en forma de bucle que funcionan como unidades independientes.

**heterocromatina, eucromatina**

***Dominios funcionales en el interior del núcleo:*** Algunos componentes nucleares se localizan en estructuras o dominios subnucleares concretos.

### NUCLÉOLO

***Genes de ARN ribosómico y la organización del nucléolo***: El nucléolo está organizado alrededor de los genes para los ARNs ribosómicos. Es el lugar de la transcripción y procesamiento del ARNr, del ensamblaje de los ribosomas y la modificación de diversos ARNs pequeños.

**nucléolo, región organizadora nucleolar**

## PALABRAS CLAVE

ARNs nucleolares pequeños (ARNsno)

***Transcripción y procesamiento del ARNr:*** El transcrito primario de los genes de ARNr es el pre-ARNr 45S, que tras su procesamiento origina los ARNr 18S 5,8S y 28S. El procesamiento del pre-ARNr está mediado por los ARNs nucleolares pequeños (ARNsno).

***Ensamblaje de ribosomas:*** Las subunidades ribosómicas se ensamblan en el nucléolo a partir de los ARNr y de las proteínas ribosómicas.

### EL NÚCLEO DURANTE LA MITOSIS

Cdc2

***Disgregación de la envuelta nuclear:*** La entrada en mitosis se debe a la activación de la proteína quinasa Cdc2. En la mayoría de las células, la envuelta nuclear se fragmenta al final de la profase. La despolimerización de la lámina nuclear ocurre por fosforilación de las láminas debido a la actividad de Cdc2 y de otras proteína quinasas.

***Condensación de los cromosomas:*** La fosforilación de las histonas H1 y H3 se correlaciona con la condensación de los cromosomas mitóticos, y la fosforilación de H3 es necesaria para una condensación adecuada de los cromosomas. Un complejo de proteínas denominado condensina es activado mediante su fosforilación por Cdc2 y participa en la condensación de los cromosomas.

***Reorganización del núcleo interfásico:*** La inactivación de Cdc2 al final de la mitosis promueve la reorganización de la envuelta nuclear y la descondensación de los cromosomas. Entonces las proteínas nucleares se importan de manera selectiva a través de los complejos del poro nuclear.

## Preguntas

**1.** Separando la transcripción de la traducción, la envuelta nuclear permite a los eucariotas regular la expresión génica mediante procesos que no se encuentran en los procariotas. ¿Cuáles son estos procesos que son exclusivos de eucariotas?

**2.** ¿Qué dos papeles juegan las láminas en la estructura y función nuclear?

**3.** Si inyectas dos proteínas, una de 15 kDa y otra de 100 kDa, y las dos carecen de señales de transporte nuclear al interior de un óvulo de rana, ¿entrará alguna en el núcleo?

**4.** ¿Qué dirige la direccionalidad del importe nuclear?

**5.** Describe cómo la actividad de un factor de transcripción regulador de un gen puede ser regulada por el importe nuclear.

**6.** Usted está estudiando un factor de transcripción regulado por la fosforilación de residuos de serina, lo que inactiva la señal de localización nuclear. ¿Cómo afectaría la sustitución de residuos de serina por alanina a la localización subcelular del factor de transcripción y a la expresión de su gen diana?

**7.** ¿Cómo afectaría una mutación en la señal de exportación nuclear de una proteína que viaja continuamente entre el núcleo y el citoplasma a su distribución subcelular?

**8.** La replicación del ADN parece tener lugar en unas 200 localizaciones específicas o fábricas de replicación. ¿Cómo localizarías estos dominios en células de mamífero en cultivo?

**9.** Las señales de localización nuclear no son escindidas por peptidasas señal como los son los péptidos de señal-ER. Dados los cambios que sufren los núcleos durante el ciclo celular, sugiera una razón por la que las señales de localización nuclear no se eliminan.

**10.** ¿Cuál es el papel de la proteína quinasa dependiente de ciclinas Cdc2 en la iniciación de la mitosis?

## Bibliografía

### *Envuelta nuclear y tráfico entre el núcleo y el citoplasma*

Akey, C. W. and M. Radermacher. 1993. Architecture of the Xenopus nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 122: 1-19. [P]

Ben-Efraim, I. and L. Gerace. 2001. Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* 152: 411-417. [P]

Chook, Y. M. and G. Blobel. 1999. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-2-Ran.GppNHp. *Nature* 399: 230-237. [P]

Chook, Y. M. and G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 703-715. [R]

Cingolani, G. C. Petosa, K. Weis and C. W. Muller. 1999. Structure of importin-β bound to the IBB domain of importin-α. *Nature* 399: 221-229. [P]

Daneholt, B. 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88: 585-588. [R]

Gant, T. M. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 13: 669-695. [R]

Gerace, L. and B. Burke. 1988. Functional or-

ganization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 353-374. [R]
Gerace, L. and R. Foisner. 1994. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* 4: 127-131. [R]
Goldman, R. D., Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker and T. P. Spann. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16: 533-547. [R]
Ohno, M., M. Fornerod and I. W. Mattaj. 1998. Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell* 92: 327-336. [R]
Ryan, K. J. and S. R. Wente 2000. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 361-371. [R]
Ullman, K. S., M. A. Powers and D. J. Forbes. 1997. Nuclear export receptors: From importin to exportin. *Cell* 90: 967-970. [R]
Vandromme, M., C. Gauthier-Rouviere, N. Lamb and A. Fernandez. 1996. Regulation of transcription factor localization: Fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 21: 59-64. [R]
Vetter, I. R., A. Arndt, U. Kutay, D. Gorlich and A. Wittinghofer. 1999. Structural view of the Ran-importin $\beta$ interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 67: 635-646. [P]
Weis, K. 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 328-335. [R]

### Organización interna del núcleo

Gall, J. G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273-300. [R]
Gilson, E., T. Laroche and S. M. Gasser. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* 3: 128-134. [R]
Hozak, P. and P. R. Cook. 1994. Replication factories. *Trends Cell Biol.* 4: 48-49. [R]
Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280: 547-553. [R]
Manuelidis, L. 1990. A view of interphase chromosomes. *Science* 250: 1533-1540. [R]
Matera, A. G. 1999. Nuclear bodies: Multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9: 302-309. [R]
Mathog, D., M. Hochstrasser, Y. Gruenbaum, H. Saumweber and J. Sedat. 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in Drosophila salivary gland nuclei. *Nature* 308: 414-421. [P]
Misteli, T., J. F. Caceres and D. L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387: 523-527. [P]
Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol.* 7: 135-138. [R]
Worman, H. J. and J. C. Courvalin. 2002. The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol.* 12: 591-598. [R]

### Nucléolo

Fatica, A. and D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 313-318. [R]
Grosshans, H., K. Deinert, E. Hurt and G. Simos. 2001. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J. Cell Biol.* 153: 745-762. [P]
Johnson, A. W., E. Lund and J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* 27: 580-585. [R]
Kiss, T. 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109: 145-148. [R]
Miller, O. L., Jr. and B. Beatty. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* 164: 955-957. [P]
Olson, M. O., K. Hingorani and A. Szebeni. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219: 199-266. [R]

### El núcleo durante la mitosis

Eide, T., C. Carlson, K. A. Tasken,T. Hirano, K. Tasken and P. Collas. 2002. Distinct but overlapping domains of AKAP95 are implicated in chromosome condensation and condensin targeting. *EMBO Rep.* 3: 426-432. [P]
Gant, T. M. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 13: 669-695. [R]
Heald, R. and F. McKeon. 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579-589. [P]
Kimura, K., M. Hirano, R. Kobayashi and T. Hirano. 1998. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282: 487-490. [P]
Koshland, D. and A. Strunnikov. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 12: 305-333. [R]
Marshall, I. C. B. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol.* 7: 69-74. [R]
Murray, A. and T. Hunt. 1993. The Cell Cycle: *An Introduction*. New York: W. H. Freeman.
Murray, A. W. 1998. How to compact DNA. *Science* 282: 425-427. [R]
Peter, M., J. Nakagawa, M. Dore[, J. C. Labb] and E. A. Nigg. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602. [P]
Uhlmann, F. 2001. Chromosome condensation: packaging the genome. *Curr. Biol.* 11: R384-R387. [R]
Ward, G. E. and M. W. Kirschner. 1990. Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 61: 561-577. [P]
Wei, Y., L. Yu, J. Brown, M. A. Gorovsky and C. D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97: 99-109. [P]

# 9

# Distribución y transporte de proteínas

## Retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas

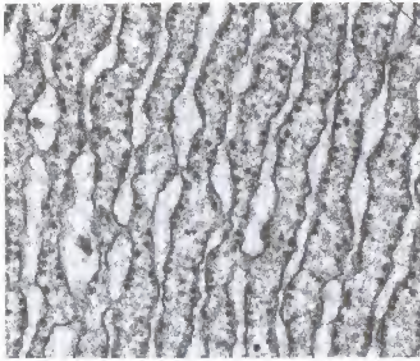


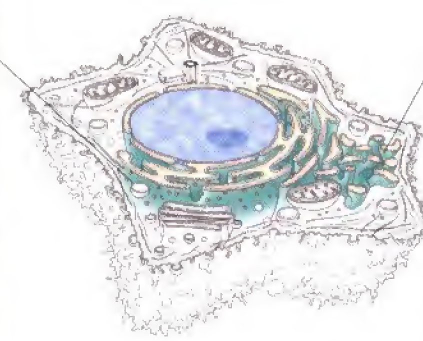
ADEMÁS DE POR LA PRESENCIA DE UN NÚCLEO, las células eucariotas se distinguen de las células procariotas por la presencia en el citoplasma de orgánulos rodeados de membrana. Estos orgánulos proporcionan compartimentos diferenciados en los que tienen lugar actividades celulares específicas, y la subdivisión resultante del citoplasma permite a las células eucariotas funcionar eficientemente a pesar de su gran tamaño (aproximadamente 1.000 veces el volumen de las bacterias).

Debido a la compleja organización interna de las células eucariotas, distribuir y dirigir a las proteínas hacia sus destinos adecuados son tareas considerables. El primer paso en la distribución de las proteínas tiene lugar mientras aún está en marcha la traducción. Muchas proteínas destinadas al retículo endoplásmico, al aparato de Golgi, a los lisosomas, a la membrana plasmática y a ser secretadas se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico. A medida que la traducción continúa, las cadenas polipeptídicas se transportan al interior del retículo endoplásmico, donde tiene lugar el plegamiento y procesamiento de las proteínas. Desde el retículo endoplásmico, las proteínas se transportan en vesículas al aparato de Golgi, donde son nuevamente procesadas y distribuidas para el transporte a los lisosomas, a la membrana plasmática o a ser secretadas desde la célula. Algunos de estos orgánulos, además de los endosomas, participan en la organización y el transporte de proteínas que son internalizadas desde el exterior celular (véase el Cap. 12). El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas se diferencian de esta manera de otros orgánulos citoplásmicos en que intervienen conjuntamente en el procesamiento de las proteínas y en que están conectados mediante vesículas de transporte.

## Retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico (ER)** es una red de túbulos y sacos (cisternas) rodeados de membrana que se extiende desde la membrana nuclear por todo el citoplasma (Fig. 9.1). Todo el retículo endoplásmico está rodeado por una membrana continua y es el orgánulo más grande de la mayoría de las células eucariotas. Su membrana puede representar aproximadamente la mitad de todas las membranas de la célula, y el espacio encerrado por el RE (la luz, o espacio de las cisternas) puede representar alrededor del 10 % de todo el volumen celular. Como se trató previamente, hay dos tipos distintos de RE que realizan funciones diferentes en la célula. El **RE rugoso**, que está cubierto por ribosomas en su superficie externa, y el **RE de transición**, de donde parten



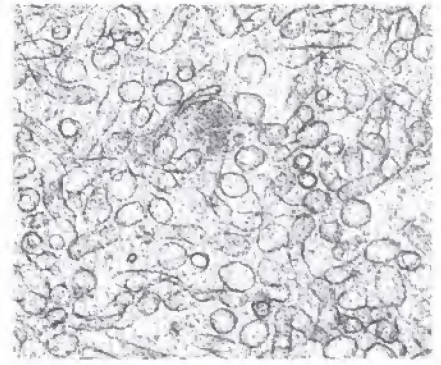



*Figura 9.1*
**Retículo endoplásmico (RE).** (A) Microfotografía electrónica del RE rugoso en células de hígado de rata. Los ribosomas están unidos a la cara citosólica de la membrana del RE. (B) Microfotografía electrónica del RE liso en las células de Leydig del testículo, que participan activamente en la síntesis de hormonas esteroideas. (A, Richard Rodewald, University of Virginia/Biological Photo Service; B, Dan Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

vesículas hacia el aparato de Golgi, funcionan ambos en el procesamiento de las proteínas. El **RE liso** no está asociado con los ribosomas y está implicado en el metabolismo de los lípidos, en lugar de en el de las proteínas.

## *Retículo endoplásmico y secreción de proteínas*

El papel del retículo endoplásmico en el procesamiento y distribución de las proteínas fue demostrado por primera vez por George Palade y sus colaboradores en los años 60 (Fig. 9.2). Estos investigadores estudiaron el destino de las proteínas recién sintetizadas en unas células especializadas del páncreas (células pancreáticas acinares) que secretan enzimas digestivas al intestino delgado. Debido a que la mayoría de las proteínas sintetizadas por estas células son secretadas, Palade y colaboradores fueron capaces de estudiar la ruta tomada por las proteínas secretadas simplemente mediante el marcaje con aminoácidos radiactivos de las proteínas recién sintetizadas. La localización en la célula de las proteínas marcadas radiactivamente se determinó a continuación mediante una autorradiografía, poniendo de manifiesto los lugares celulares implicados en los procesos que conducen a la secreción de las proteínas. Después de una breve exposición de las células acinares pancreáticas a los aminoácidos radiactivos, se detectaron proteínas sintetizadas *de novo* en el RE rugoso, por lo que se le identificó como el lugar de síntesis de las proteínas destinadas a la secreción. Si a continuación las células se incubaban durante un corto período de tiempo en un medio que contenía aminoácidos no radiactivos (proceso conocido como *caza*), las proteínas marcadas radiactivamente se detectaban en el aparato de Golgi. Tras períodos de caza más largos, las proteínas marcadas radiactivamente migraban desde el aparato de Golgi a la superficie celular en **vesículas de secreción**, que posteriormente se fusionaban con la membrana plasmática para liberar su contenido fuera de la célula.

Estos experimentos definieron una vía tomada por las proteínas secretadas, la **vía secretora:** RE rugoso → Golgi → vesículas de secreción-exterior de la célula. Estudios adicionales ampliaron estos resultados y demostraron que esta vía no está restringida a las proteínas destinadas a ser secretadas. Las proteínas de la membrana plasmática y las lisosómicas también migran desde el RE rugoso hasta el Golgi y posteriormente a sus destinos finales. Otras proteínas pasan por las etapas iniciales de la vía secretora pero posteriormente son retenidas y su actividad tiene lugar en el RE o en el aparato de Golgi.

Por lo tanto, la entrada de las proteínas en el RE representa un cruce de caminos muy importante en el tráfico de proteínas en las células eucariotas. Las proteínas destinadas a ser secretadas o a incorporarse en el RE, aparato de Golgi, lisosomas, o membrana plasmática son dirigidas inicialmente al RE. En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas son transferidas al RE mientras están siendo traducidas por los ribosomas unidos a la membrana

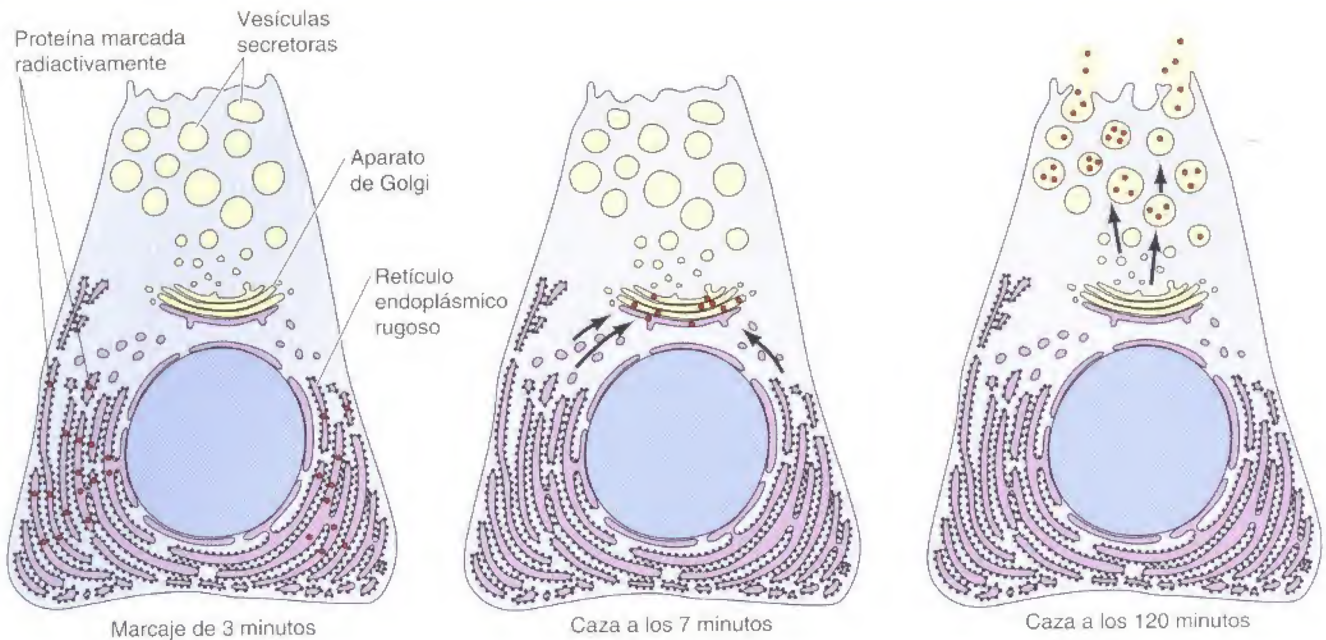



*Figura 9.2*
**Vía secretora.** Las células acinares pancreáticas, que secretan la mayor parte de sus proteínas sintetizadas *de novo* en el tracto digestivo, se marcaron con aminoácidos radiactivos para estudiar la vía intracelular utilizada por las proteínas secretadas. Tras un corto periodo de incubación con aminoácidos radiactivos (marcaje de 3 minutos), la autorradiografía puso de manifiesto que las proteínas sintetizadas *de novo* se localizaban en el RE rugoso. Tras una incubación posterior con aminoácidos no radiactivos (caza), se observó que las proteínas se habían desplazado desde el RE al aparato de Golgi y después, en el interior de vesículas de secreción, a la membrana plasmática y al exterior de la célula.

(Fig. 9.3). Por el contrario, las proteínas destinadas a permanecer en el citosol o que se van a incorporar al núcleo, a las mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas son sintetizadas en los ribosomas libres y liberadas al citosol cuando finaliza su traducción.

## Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico

Las proteínas pueden ser translocadas al RE durante su síntesis en los ribosomas unidos a la membrana (translocación cotraduccional) o una vez que la traducción se ha completado en los ribosomas libres en el citosol (translocación postraduccional). En las células de los mamíferos, la mayoría de las proteínas entran en el RE de manera cotraduccional, mientras que en las levaduras se utilizan tanto la vía cotraduccional como la postraduccional. El primer paso en la vía cotraduccional es la asociación de los ribosomas con el RE. La marca que determina que los ribosomas se unan con la membrana del RE es la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica que está siendo sintetizada, en vez de propiedades intrínsecas del propio ribosoma. Los ribosomas libres y los unidos a la membrana son funcionalmente indistinguibles, y toda la síntesis proteica se inicia en los ribosomas que están libres en el citosol. Los ribosomas implicados en la síntesis de proteínas destinadas a ser secretadas están marcados para dirigirse al retículo endoplásmico mediante **una secuencia señal** localizada en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Estas secuencias señal son pequeños segmentos de aminoácidos hidrófobos que son escindidos de la cadena polipeptídica durante su transferencia a la luz del RE.

El papel general de las secuencias señal para dirigir a las proteínas a sus localizaciones adecuadas en la célula se dilucidó por primera vez mediante estudios sobre la internalización de las proteínas de secreción en el RE. Estos experimentos utilizaron preparaciones *in vitro* de RE rugoso, que se aislaron de extractos celulares mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Fig. 9.4). Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas **microsomas**. Puesto que las vesículas derivadas del RE rugoso están recubiertas por ribosomas, éstas pueden separarse de vesículas similares derivadas del RE liso o de otras membranas (p. ej., la membrana plasmáti-

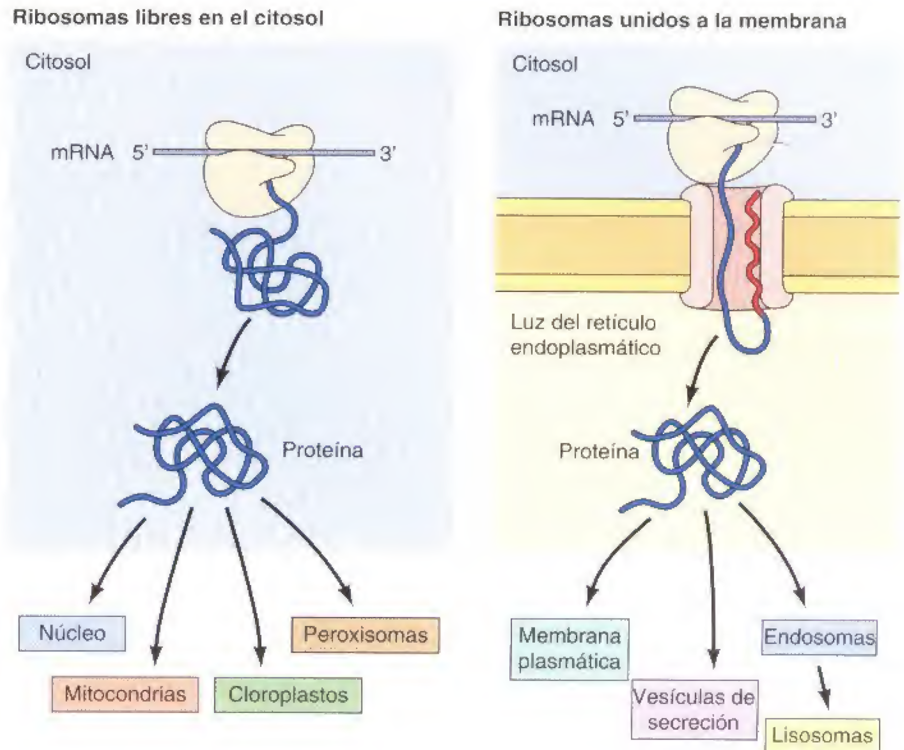
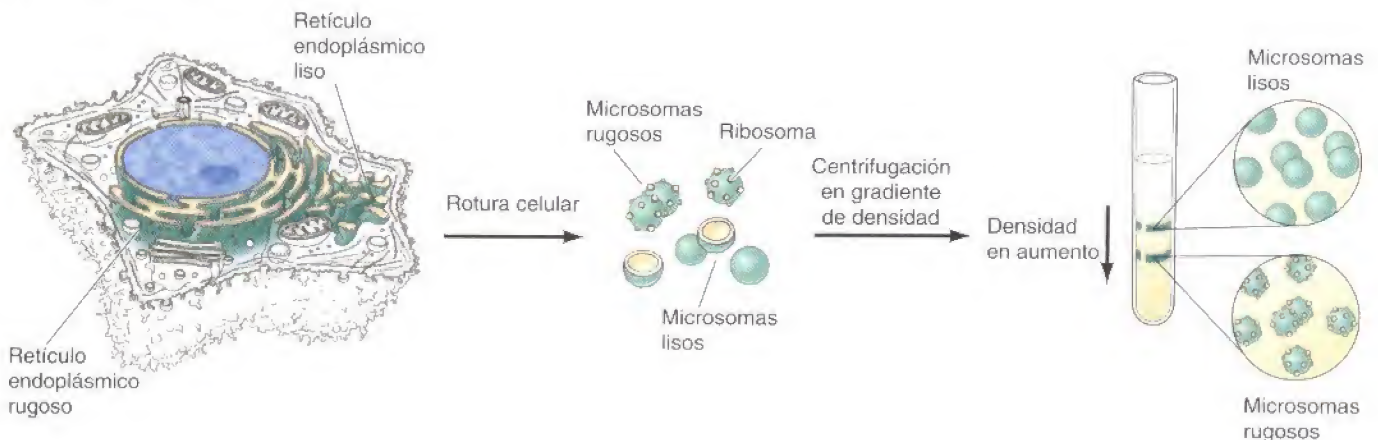


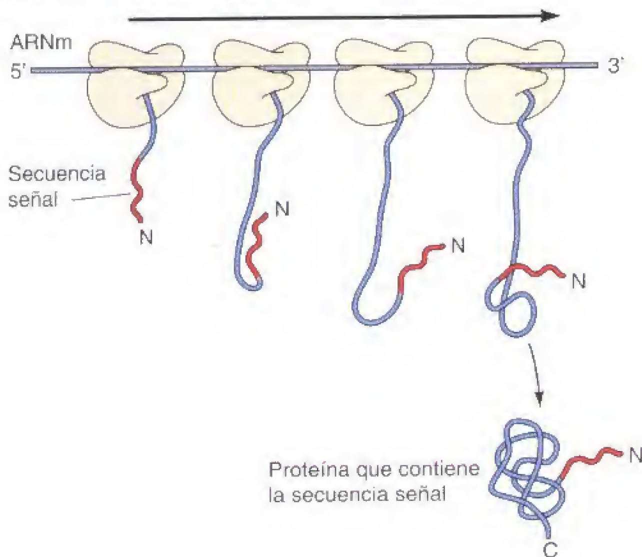

*Figura 9.3*
**Esquema general de la distribución de las proteínas.** En las células de los mamíferos, la distribución inicial de las proteínas al RE se produce mientras tiene lugar la traducción. Las proteínas sintetizadas en los ribosomas libres permanecen en el citosol o son transportadas al núcleo, mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas. Por el contrario, las proteínas sintetizadas en los ribosomas unidos a la membrana se translocan al interior del RE mientras se están traduciendo. Pueden ser retenidas en el RE o transportadas al aparato de Golgi, y de allí a los lisosomas, a la membrana plasmática, o al exterior celular mediante vesículas de secreción.

ca). Concretamente, la gran cantidad de ARN existente en los ribosomas aumenta la densidad de las vesículas de membrana a las que están unidos, permitiendo la purificación de las vesículas derivadas del RE rugoso (microsomas rugosos) mediante centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad.

David Sabatini y Günter Blobel propusieron por primera vez en 1971 que la señal para la unión del ribosoma al RE era una secuencia de aminoácidos próxima al extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Esta hipótesis fue apoyada por los resultados de la traducción *in vitro* de ARNm que codifican proteínas secretadas, como las inmunoglobulinas (Fig. 9.5). Si un ARNm que codifica una proteína secretada era traducido *in vitro* por ribosomas libres, se observaba que la proteína producida era ligeramente mayor que la proteína normal secretada. Sin embargo, si se añadían microsomas al sistema la proteína traducida *in vitro* se incorporaba a los microsomas y se escindía en el tamaño adecuado. Estos experimentos condujeron a que se formulara de una manera más detallada la hipótesis de la señal, proponiendo que una secuencia

*Figura 9.4*
**Aislamiento del RE rugoso.** Cuando las células se rompen, el RE se fragmenta en pequeñas vesículas denominadas microsomas. Los microsomas derivados del RE rugoso (microsomas rugosos) están rodeados por ribosomas en su superficie externa. Debido a que los ribosomas contienen una gran cantidad de ARN, los microsomas rugosos son más densos que los microsomas lisos y se pueden aislar mediante centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad.





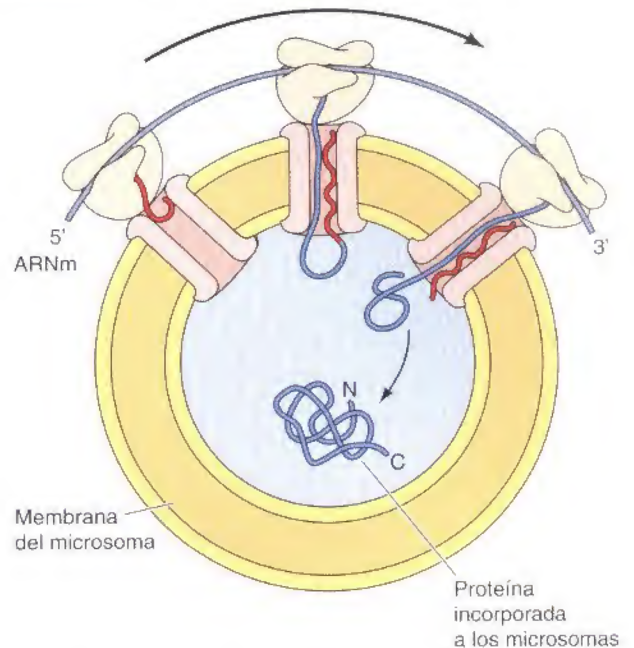



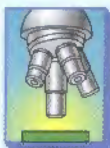

*Figura 9.5*
**Incorporación de las proteínas de secreción a los microsomas.** Las proteínas de secreción son dirigidas al RE por una secuencia señal localizada en su extremo amino(N)-terminal, que se elimina durante la incorporación de la cadena polipeptídica en crecimiento al RE. Esto se demostró mediante experimentos que mostraron que la traducción de los ARNm de una proteína de secreción en los ribosomas libres daba lugar a proteínas que mantenían su secuencia señal y que por tanto eran ligeramente más grandes que las proteínas de secreción normales. Sin embargo, cuando se añadían microsomas al sistema, las cadenas polipeptídicas en crecimiento se incorporaban a los microsomas y las secuencias señal eran eliminadas mediante una rotura proteolítica.

guía amino-terminal marca y dirige la cadena polipeptídica a los microsomas y que es escindida posteriormente por una proteasa microsomal. Muchos hallazgos posteriores han sostenido este modelo, incluyendo experimentos con ADN recombinante que han demostrado que la adición de una secuencia señal a una proteína que normalmente no es secretada es suficiente para dirigir la incorporación de la proteína recombinante al RE rugoso.

El mecanismo por el que las proteínas secretadas son dirigidas al RE durante su traducción (vía cotraduccional) se conoce bien actualmente. Las secuencias señal están constituidas aproximadamente por 20 aminoácidos, incluyendo un grupo de residuos hidrófobos, habitualmente en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica (Fig. 9.6). A medida que salen del ribosoma, las secuencias señal son reconocidas y unidas a una **partícula de reconocimiento de la señal (PRS)** que está constituida por seis polipéptidos y un ARN citoplásmico pequeño (**ARNsrp**). La PRS se une tanto al ribosoma como a la secuencia señal, inhibiendo la traducción y dirigiendo todo el complejo (PRS, ribosoma, y la cadena polipeptídica en crecimiento) al RE mediante la unión al receptor de la PRS en la membrana del RE (Fig. 9.7). La unión al receptor libera a la PRS del ribosoma y de la secuencia señal de la cadena polipeptídica en crecimiento. Entonces el ribosoma se une a un complejo de translocación de proteínas en la membrana del RE, y la secuencia señal es insertada en un canal de la membrana o **translocón**. En las levaduras y en las células de los mamíferos, los translocones que atraviesan la membrana del RE están constituidos por tres proteínas transmembrana, denominadas proteínas Sec61. Las proteínas Sec61 de las levaduras y los mamíferos están estrechamente relacionadas con las proteínas de la membrana plasmática que translocan los polipéptidos secretados en las bacterias, demostrándose una conservación significativa de la maquinaria de secreción de proteínas en las células procariotas y eucariotas. La transferencia

*Figura 9.6*
**Secuencia señal de la hormona del crecimiento.** La mayoría de las secuencias señal contienen un segmento de aminoácidos hidrófobos, precedido por residuos básicos (p. ej., arginina).





## Experimento clave

# *Hipótesis de la señal*

**Transferencia de proteínas a través de membranas. I. Presencia de cadenas ligeras de inmunoglobulinas procesadas proteolíticamente y sin procesar en ribosomas unidos a membrana procedentes de mieloma murino**

Günter Blobel y Bernhard Dobberstein

Rockefeller University, New York

*Journal of Cell Biology, 1975, Volumen 67, págs. 835-851*

### Contexto

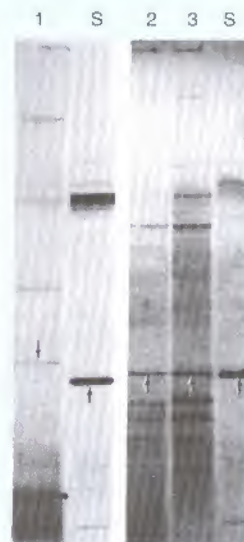
¿Cómo se transfieren las cadenas polipeptídicas específicas a través de las membranas adecuadas? Estudios en los años 50 y 60 indicaban que las proteínas secretadas eran sintetizadas en ribosomas unidos a membrana y que se transferían a través de la membrana durante su síntesis. Sin embargo, esto no explicaba por qué los ribosomas implicados en la síntesis de las proteínas secretadas se unen a la membrana mientras que los ribosomas que sintetizan las proteínas citosólicas no lo hacen. Una hipótesis para explicar esta diferencia fue sugerida por primera vez por Günter Blobel y David Sabatini en 1971. En ese momento propusieron que (1) Los ARNm que se traducían en los ribosomas unidos a membrana contenían un conjunto característico de codones justo en 3' a partir del sitio de iniciación, (2) la traducción de estos codones genera una secuencia característica en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento (la secuencia señal), y (3) la secuencia señal provoca la unión del ribosoma a la membrana. En 1975, Blobel y Dobberstein informaron acerca de una serie de experimentos que apoyaban esta idea. Además, propusieron una «versión algo más detallada de esta hipótesis, en lo sucesivo llamada la hipótesis de la señal».

### Experimentos

Los mielomas son cánceres de linfocitos B que secretan inmunoglobulinas activamente, por lo que proporcionan un buen modelo para los estudios de proteínas secretadas. Estudios previos en el laboratorio de Cesar Milstein habían demostrado que las proteínas producidas por la traducción *in vitro* del ARNm de la cadena ligera de las inmunoglobulinas contienen aproximadamente 20 aminoácidos en su extremo amino-terminal que no están presentes en las cadenas ligeras secretadas. Este resultado condujo a la suposición de que estos aminoácidos dirigen la unión del ribosoma a la membrana. Para comprobar esta idea, Blobel y Dobberstein investigaron la síntesis de cadenas ligeras, por ribosomas unidos a membrana, a partir de las células del mieloma.

Como era de esperar por trabajos previos, la traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras en los ribosomas libres daba lugar a una proteína que era más grande que la cadena ligera secretada (véase la Figura). Por el contrario, la traducción *in vitro* del ARNm asociado a los ribosomas unidos a membrana de las células del mieloma, daba lugar a una proteína que tenía el mismo tamaño que la cadena ligera secretada normal. Es más, las cadenas ligeras sintetizadas por los ribosomas que permanecían unidos a los microsomas eran resistentes a la digestión por proteasas añadidas, lo que indicaba que las cadenas ligeras habían sido trasferidas a los microsomas.

Estos resultados indicaban que una secuencia señal amino-terminal es eliminada por una proteasa




La traducción *in vitro* del ARNm de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas en ribosomas libres (carril 1) da lugar a un producto que migra más lentamente que las cadenas ligeras secretadas (carril S) en la electroforesis en gel. Por el contrario, las cadenas ligeras sintetizadas por la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membranas (carril 2) tienen el mismo tamaño que las cadenas ligeras secretadas. Además, a los productos de la traducción *in vitro* en ribosomas unidos a membrana no les afectó la digestión posterior con proteasas (carril 3), lo que indica que estaban protegidos de las proteasas por la inserción en los microsomas.

del ribosoma desde la PRS al complejo Sec61 permite que se reanude la traducción, y la cadena polipeptídica en crecimiento se transfiere directamente al canal Sec61 y atraviesa la membrana del RE a medida que continúa la traducción. Así, el proceso de la síntesis de proteínas dirige directamente la transferencia de las cadenas polipeptídicas en crecimiento a través del canal Sec61 y

### *Hipótesis de la señal* *(continuación)*

en los microsomas a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se trasfieren a través de la membrana. Los resultados se interpretaron en términos de una versión más detallada de la hipótesis de la señal. Como expusieron Blobel y Dobberstein «la característica esencial de la hipótesis de la señal es la existencia de una secuencia única de codones, localizada inmediatamente a la derecha del codon de iniciación, que está presente sólo en aquellos ARNm cuyos productos de traducción han de ser transferidos a través de una membrana.»

### Impacto

La transferencia selectiva de proteínas a través de las membranas es fundamental para el mantenimiento de los orgánulos rodeados por membrana de las células eucariotas. Para mantener la identidad de estos orgánulos, las proteínas deben ser translocadas específicamente a través de las membranas apropiadas. La hipótesis de la señal proporcionó la base conceptual para comprender este fenómeno. Este modelo básico no sólo ha sido comprobado firmemente para la transferencia de proteínas secretadas en el retículo endoplásmico, sino que también ha proporcionado el marco para comprender el marcaje y dirección de las proteínas a todos los compartimentos de la célula rodeados por membrana, y por consiguiente causando un impacto en prácticamente todas las áreas de la biología celular.



Günter Blobel

al interior del RE. A medida que continúa la translocación, la **peptidasa señal** escinde la secuencia señal y el polipéptido es liberado en la luz del RE.

Muchas proteínas en las levaduras, así como algunas proteínas en las células de los mamíferos, son dirigidas al RE tras haber sido traducidas (translocación postraduccional), en lugar de ser transferidas al RE durante su síntesis en



*Figura 9.7*
**Dirección cotraduccional de proteínas de secreción al RE.** Paso 1: A medida que la secuencia señal emerge del ribosoma, es reconocida y unida a la partícula de reconocimiento de la señal (PRS). Paso 2: La PRS acompaña al complejo hasta la membrana del RE, donde se une al receptor de la PRS. Paso 3: La PRS se libera, el ribosoma se une a un translocón, y la secuencia señal se inserta en un canal de membrana. Paso 4: Se reanuda la traducción, y la cadena polipeptídica en crecimiento es translocada a través de la membrana. Paso 5: La escisión de la secuencia señal por la peptidasa de la señal libera el polipéptido en la luz del RE.

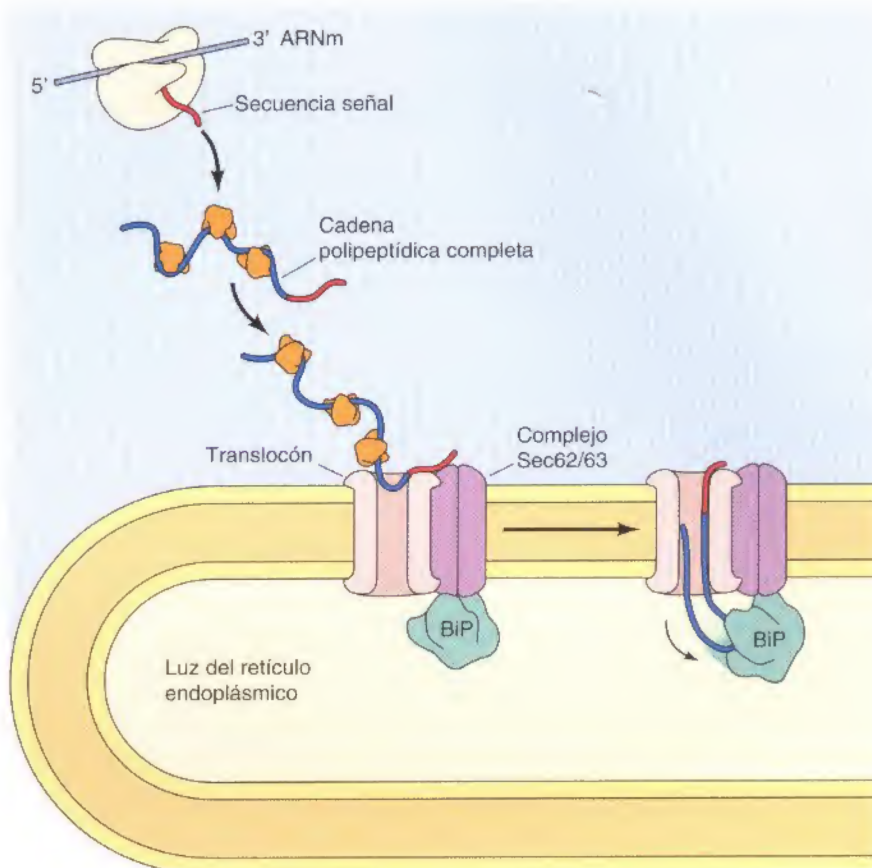



*Figura 9.8*
**Translocación postraduccional de las proteínas en el RE.** Las proteínas destinadas a una internalización postraduccional al RE se sintetizan en ribosomas libres y se mantienen en una conformación desplegada mediante chaperonas citosólicas. Sus secuencias señal son reconocidas por el complejo Sec62/63, que está asociado con el translocón en la membrana del RE. La proteína Sec63 también está asociada con una proteína chaperona (BiP), que actúa como un «trinquete» molecular dirigiendo la translocación de la proteína al interior del RE.

los ribosomas unidos a la membrana. Estas proteínas son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres, y su incorporación postraduccional al RE no requiere una PRS. En su lugar, sus secuencias señal son reconocidas por proteínas receptoras diferentes (el complejo Sec62/63) asociadas con el translocón en la membrana del RE (Fig. 9.8). Se requieren las chaperonas citosólicas Hsp70 para mantener a las cadenas polipeptídicas en su conformación primaria para que puedan penetrar en el translocón, y otra chaperona Hsp70 en el interior del RE (denominada BiP) es necesaria para permitir que la cadena polipeptídica atraviese el canal hasta el interior del RE. Parece que la unión de las cadenas polipeptídicas a BiP es necesaria para dirigir la traslocación postraduccional de las proteínas al RE, mientras que la translocación cotraduccional de las cadenas polipeptídicas en crecimiento está dirigida directamente por el proceso de la síntesis proteica.

## *Inserción de las proteínas en la membrana del RE*

Las proteínas cuyo destino es ser secretadas o residir en la luz del RE, aparato de Golgi, o lisosomas son translocadas a través de la membrana y liberadas en la luz del RE tal como ya se ha descrito. Sin embargo, las proteínas destinadas a incorporarse en la membrana plasmática o en la membrana del RE, Golgi, o lisosomas se insertan inicialmente en la membrana del RE en lugar de ser liberadas a la luz. Desde la membrana del RE continúan hasta su destino final por la misma ruta que la de las proteínas secretadas: RE-Golgi-Membrana plasmática o lisosomas. Sin embargo, estas proteínas son transportadas a lo largo de esta ruta como componentes de la membrana, en lugar de como proteínas solubles.

Las proteínas integrales de la membrana se incluyen en la membrana mediante regiones hidrofóbicas que atraviesan la bicapa lipídica (Fig. 2.48). Las partes de estas proteínas que atraviesan la membrana suelen ser regiones en

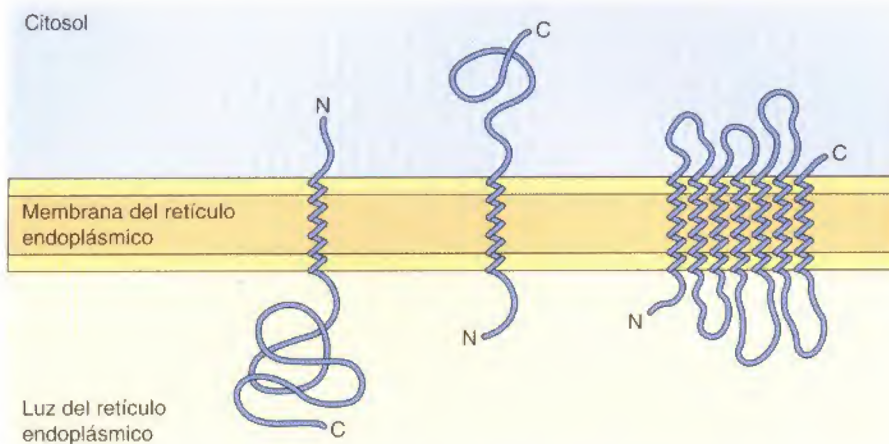



*Figura 9.9*
**Orientaciones de las proteínas de membrana.** Las proteínas integrales de la membrana atraviesan la membrana mediante regiones en alfa-hélice de 20 a 25 aminoácidos hidrófobos, que pueden insertarse con distintas orientaciones. Las proteínas de la izquierda y del centro atraviesan la membrana una única vez, pero se diferencian en función de que sea el extremo amino (N) o carboxilo (C) terminal el que está en el lado citoplásmico. A la derecha hay un ejemplo de una proteína que tiene múltiples regiones que atraviesan la membrana.

hélice alfa constituidas por 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. La formación de una hélice alfa maximiza los puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos, y las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos interaccionan con las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. Sin embargo, las distintas proteínas integrales de la membrana difieren en cómo están insertadas. (Fig. 9.9). Por ejemplo, mientras que algunas proteínas integrales atraviesan la membrana una sola vez, otras tienen múltiples regiones que atraviesan la membrana. Además, algunas proteínas están orientadas en la membrana con su extremo amino-terminal en el lado citosólico; otras tienen su extremo carboxilo-terminal expuesto al citosol. La orientación de las proteínas insertadas en el RE, Golgi, lisosomas y membranas plasmáticas se establece a medida que las cadenas polipeptídicas en crecimiento se translocan en el RE. La luz del RE equivale topológicamente al exterior de la célula, por lo que los dominios de las proteínas de la membrana plasmática que están expuestos en la superficie celular se corresponden con las regiones de la cadena polipeptídica que se translocan al interior del RE (Fig. 9.10).

El mecanismo más directo de inserción en la membrana del RE da como resultado la síntesis de proteínas transmembrana orientadas con sus extremos carboxilo terminal hacia el citosol (Fig. 9.11). Estas proteínas tienen una secuencia señal amino terminal normal, que es escindida por la peptidasa señal durante la translocación de la cadena polipeptídica a través de la membrana del RE por el translocón. Seguidamente se anclan a la membrana por una segunda hélice alfa que atraviesa la membrana, localizada en el centro de la proteína. Esta secuencia transmembrana, denominada secuencia de detención de la transferencia, determina el cierre del canal translocón. De este modo se bloquea que la cadena polipeptídica se siga translocando a través de la membrana del RE, por lo que la porción carboxilo terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento se sintetiza en el citosol. Ahora se produce la separación de las subunidades del translocón y el dominio trasmembrana de la proteína penetra en la bicapa lipídica. Por lo tanto, la inserción de estas proteínas en la membrana implica la acción secuencial de dos elementos diferentes: una secuencia señal amino terminal susceptible de ser escindida que inicia la translocación a través de la membrana, y una secuencia transmembrana de detención de la transferencia que ancla la proteína a la membrana.

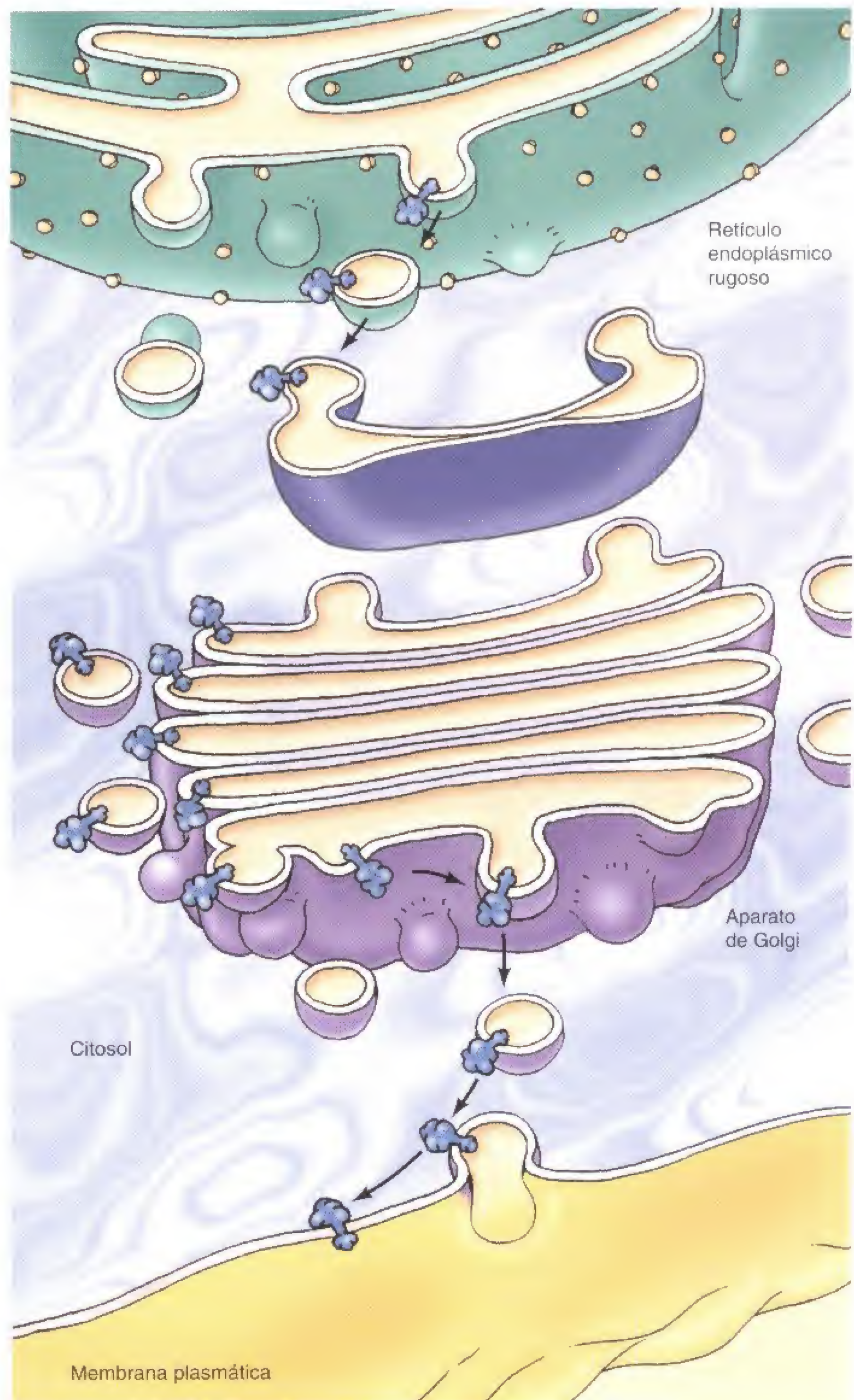



*Figura 9.10*
**Topología de la vía secretora.** La luz del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi son topológicamente equivalentes al exterior de la célula. Por tanto, aquellas partes de las cadenas polipeptídicas que se translocan al interior del RE son expuestas en la superficie celular tras su transporte a la membrana plasmática.

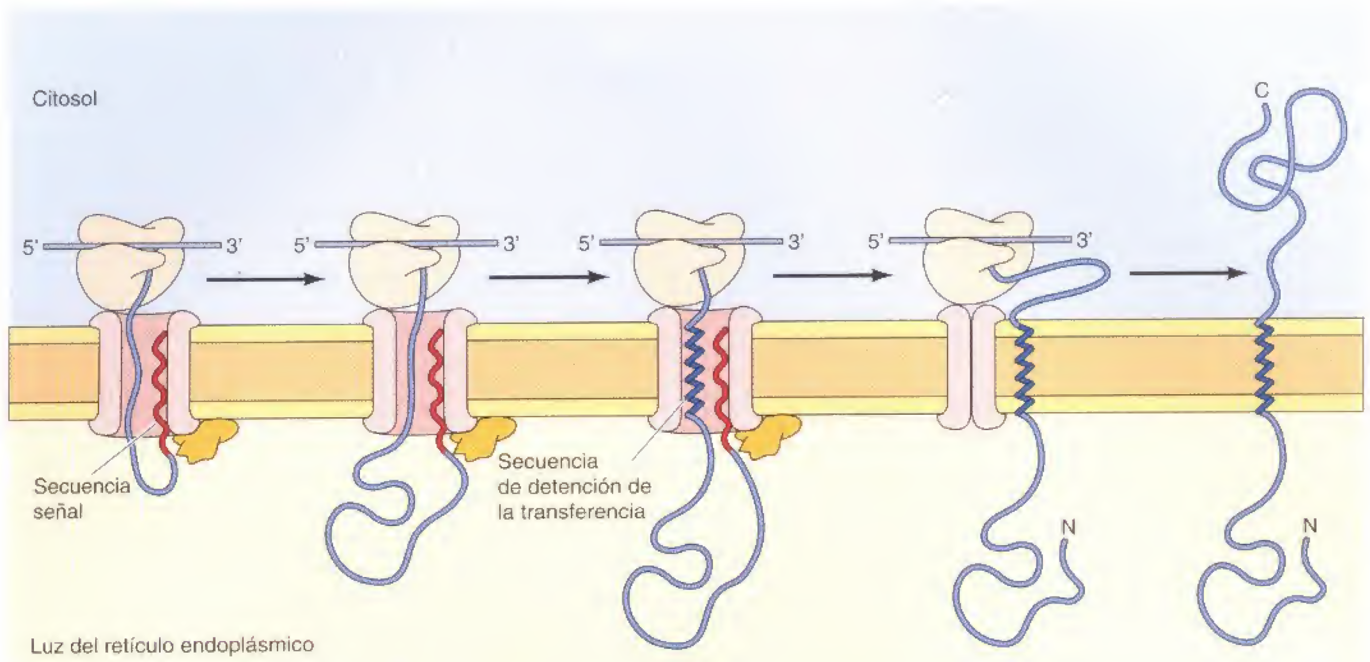



*Figura 9.11*
**Inserción de una proteína de membrana con una secuencia señal susceptible de escisión y una única secuencia de detención de la transferencia.** La secuencia señal se escinde a medida que la cadena polipeptídica atraviesa la membrana, por lo que el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica queda expuesto a la luz del RE. Sin embargo, la translocación de la cadena polipeptídica a través de la membrana es interrumpida por una secuencia transmembrana de detención de la transferencia, que cierra el canal de translocación Sec61 y abandona el canal lateralmente para anclar la proteína a la membrana del RE. La continuación de la traducción da lugar a una proteína que atraviesa la membrana con su extremo carboxilo terminal en el lado citosólico.

Las proteínas también pueden anclarse en la membrana del RE mediante secuencias señal internas que no son escindidas por la peptidasa señal (Fig. 9.12). Estas secuencias señal internas son reconocidas por la PRS y trasladadas a la membrana del RE de la manera vista hasta ahora. Sin embargo, debido a que no son escindidas por la peptidasa señal, estas secuencias señal actúan como hélices alfa transmembrana que abandonan el canal de translocación y anclan a las proteínas a la membrana del RE. Es importante señalar que las secuencias señal internas pueden estar orientadas de tal manera que dirijan la translocación a través de la membrana bien del extremo amino o bien del extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. Por tanto, dependiendo de la orientación de la secuencia señal, las proteínas insertadas en la membrana mediante este mecanismo pueden tener bien su extremo amino o bien su extremo carboxilo terminal expuesto al citosol.

Las proteínas que atraviesan la membrana varias veces se piensa que son insertadas como resultado de una serie alternante de secuencias señal internas y secuencias transmembrana de detención de la transferencia. Por ejemplo, una secuencia señal interna puede dar lugar a la inserción en la membrana de una cadena polipeptídica con su extremo amino terminal en el lado citosólico (Fig. 9.13). Si a continuación se encuentra una secuencia de detención de la transferencia, el polipéptido formará un bucle en la luz del RE, y la síntesis de la proteína continuará en el lado citosólico de la membrana. Si aparece una segunda secuencia señal, la cadena polipeptídica en crecimiento se insertará otra vez en el RE, dando lugar a otro dominio en forma de bucle en el lado citosólico de la membrana. A esto le puede seguir otra secuencia de detención de la transferencia, por lo que una serie alternante de secuencias señal y de detención de la transferencia pueden dar lugar a la inserción de las proteínas que atraviesan

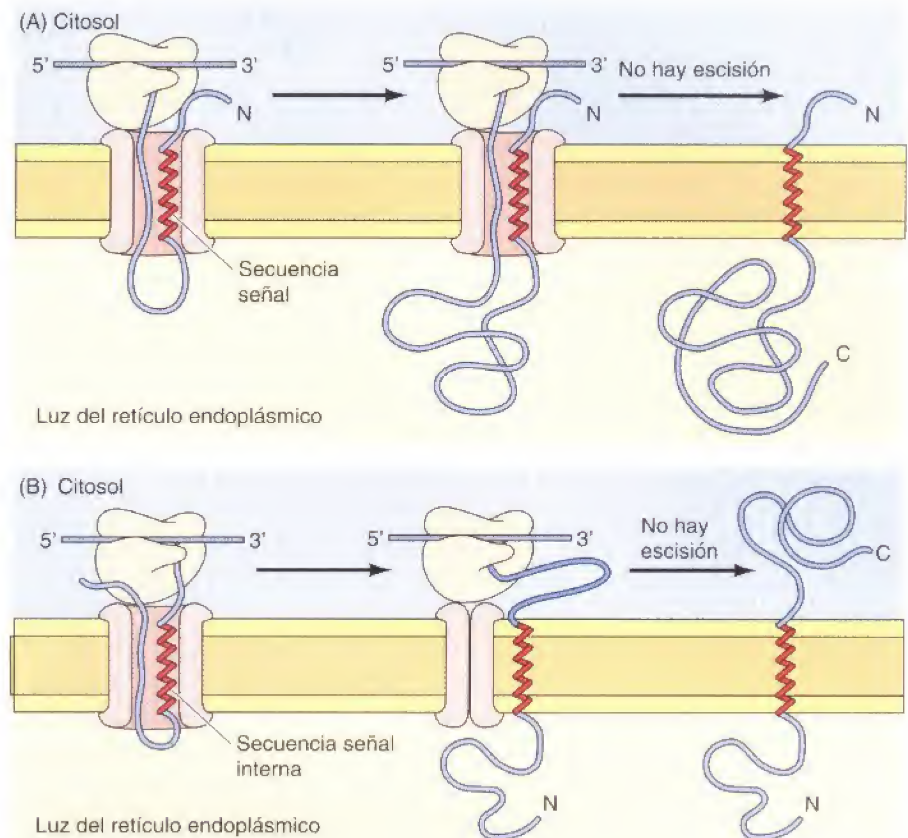



*Figura 9.12*
**Inserción de proteínas de membrana con secuencias señal internas que no se escinden.** Las secuencias señal internas que no se escinden pueden dar lugar a la inserción de cadenas polipeptídicas en cualquier orientación en la membrana del RE. (A) La secuencia señal dirige la inserción del polipéptido de tal forma que su extremo amino terminal queda expuesto al lado citosólico. El resto de la cadena polipeptídica se transloca al interior del RE a medida que continúa la traducción. La secuencia señal no se escinde, por lo que actúa como una secuencia que atraviesa la membrana que ancla la proteína a la membrana con su extremo carboxilo terminal en la luz del RE. (B) Otras secuencias señal internas se orientan de tal manera que dirigen la transferencia de la porción amino terminal del polipéptido a través de la membrana. Al continuar la traducción se forma una proteína que atraviesa la membrana del RE con su extremo amino terminal en la luz y su extremo carboxilo terminal en el citosol. Obsérvese que esta orientación es la misma que la que resulta de la inserción de una proteína que contiene una secuencia señal que se escinde seguida de una secuencia de detención de la transferencia (véase Fig. 9.11).

la membrana varias veces, con dominios en forma de bucle expuestos tanto a la luz del RE como al lado citoplásmico.

## *Plegamiento y procesamiento de las proteínas en el RE*

El plegamiento de las cadenas polipeptídicas en sus conformaciones tridimensionales correctas, el ensamblaje de los polipéptidos en proteínas constituidas por varias subunidades, y las modificaciones covalentes implicadas en el procesamiento de las proteínas se trataron en el Capítulo 7. Con respecto a las proteínas que entran en la vía secretora, muchos de estos acontecimientos ocurren durante la translocación a través de la membrana del RE o en el interior de la luz del RE. Uno de estos procesos es la rotura proteolítica del péptido señal a medida que la cadena polipeptídica se transloca a través de la membrana del RE. El RE es también el sitio donde tiene lugar el plegamiento de las proteínas, el ensamblaje de proteínas de varias subunidades, la formación de los puentes disulfuro, las primeras etapas de la glicosilación, y la adición de anclajes de glicolípidos a algunas proteínas de la membrana plasmática. De hecho, el papel principal de las proteínas de la luz del RE es catalizar el plegamiento y ensamblaje de los polipéptidos recién translocados.

Como ya se ha dicho, las proteínas se translocan a través de la membrana del RE a modo de cadenas polipeptídicas sin plegar mientras prosigue su traducción. Por lo tanto, estos polipéptidos se pliegan en su conformación tridimensional en el RE, asistidos por las chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento de las cadenas polipeptídicas (véase Cap. 7). Se cree que la chaperona Hsp70, BiP, se une a la cadena polipeptídica sin plegar cuando cruza la membrana, y después media el plegamiento proteico y el ensamblaje de proteínas con múltiples subunidades, en el interior del RE (Fig. 9.14). Las proteínas correctamente ensambladas son liberadas de BiP y otras chaperonas, y así

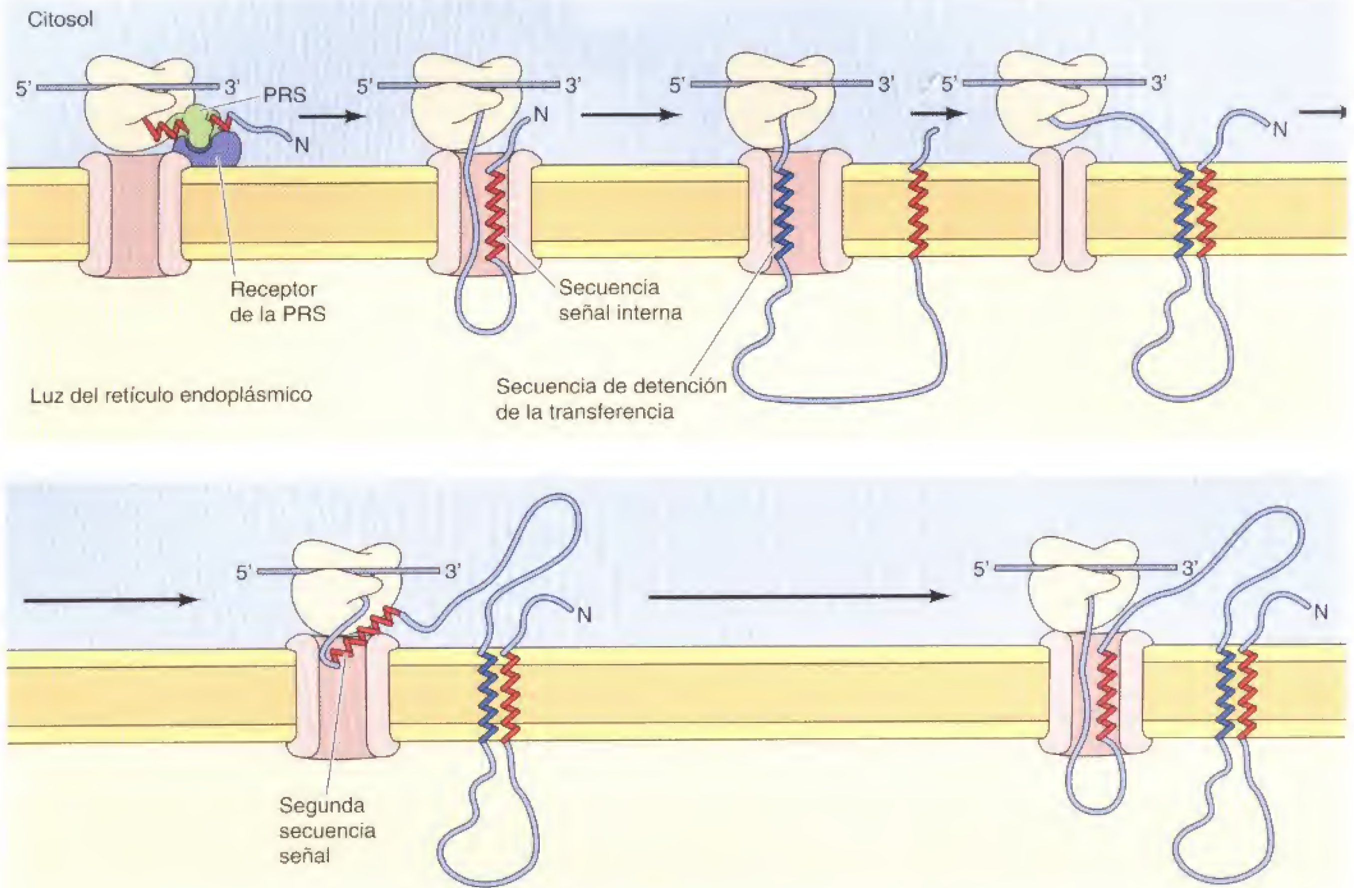



*Figura 9.13*
**Inserción de una proteína que atraviesa la membrana varias veces.** En este ejemplo, una secuencia señal interna da lugar a la inserción de la cadena polipeptídica con su extremo amino terminal en el lado citosólico de la membrana. Una secuencia de detención de la transferencia a continuación determina el cierre del canal de translocación, lo que provoca que la cadena polipeptídica forme un bucle en la luz del RE, y la traducción continúa en el citosol. Una segunda secuencia señal interna produce la reapertura del canal, lo que provoca la reinserción de la cadena polipeptídica en la membrana del RE y formándose un bucle en el citosol. El proceso puede repetirse muchas veces, dando lugar a la inserción de proteínas con múltiples regiones que atraviesan la membrana.

están disponibles para su transporte al aparato de Golgi. Las proteínas plegadas de forma anómala o incorrectamente ensambladas son dianas de degradación, como se estudia más adelante.

La formación de puentes disulfuro entre las cadenas laterales de los residuos de cisteína es un aspecto importante del plegamiento y ensamblaje proteico en el RE. Estos puentes no se forman en el citosol, que se caracteriza por ser un ambiente reductor que mantiene los residuos de cisteína en su estado reducido (—SH). En el RE, sin embargo, un ambiente oxidante promueve la formación de puentes disulfuro (S—S), y los puentes disulfuro formados en el RE desempeñan un papel importante en la estructura de las proteínas secretadas y de la superficie celular. La formación de los puentes disulfuro está favorecida por la enzima **proteína disulfuro isomerasa** (véase Fig. 7.21) que se localiza en la luz del RE.

Las proteínas también son glicosiladas en residuos específicos de asparragina (*N*-glicosilación), en el RE, mientras se están traduciendo (Fig. 9.15). Como se trató en el Capítulo 7, se añaden unidades de oligosacáridos constituidas por 14 residuos de azúcar a los residuos de asparragina de las cadenas polipeptídicas en crecimiento, mientras están siendo translocadas al RE. El oligosacárido se sintetiza en un transportador lipídico (dolicol) anclado en la membrana del RE. Después se transfiere como una unidad a los residuos de asparragina aceptores en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr mediante una enzima unida a la membrana denominada oligosacaril transferasa. Se eliminan cuatro residuos de azúcar (tres glucosas y una manosa) mientras la proteína aún está en el RE, y la proteína es modificada posteriormente después de haber sido transportada al aparato de Golgi (lo que se tratará posteriormente en este capítulo).

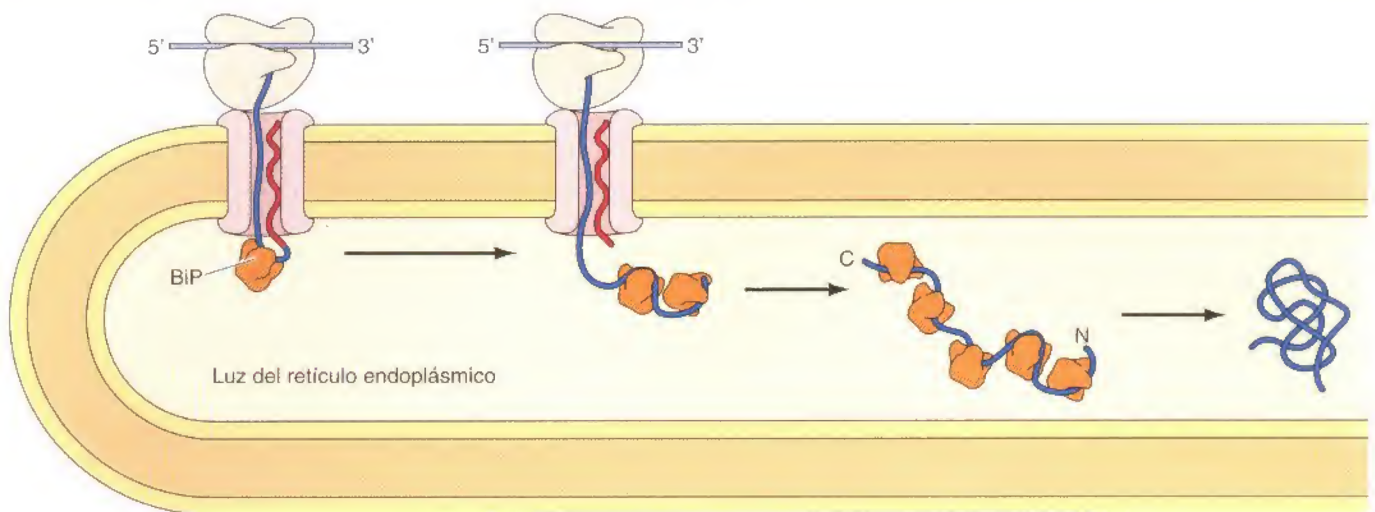
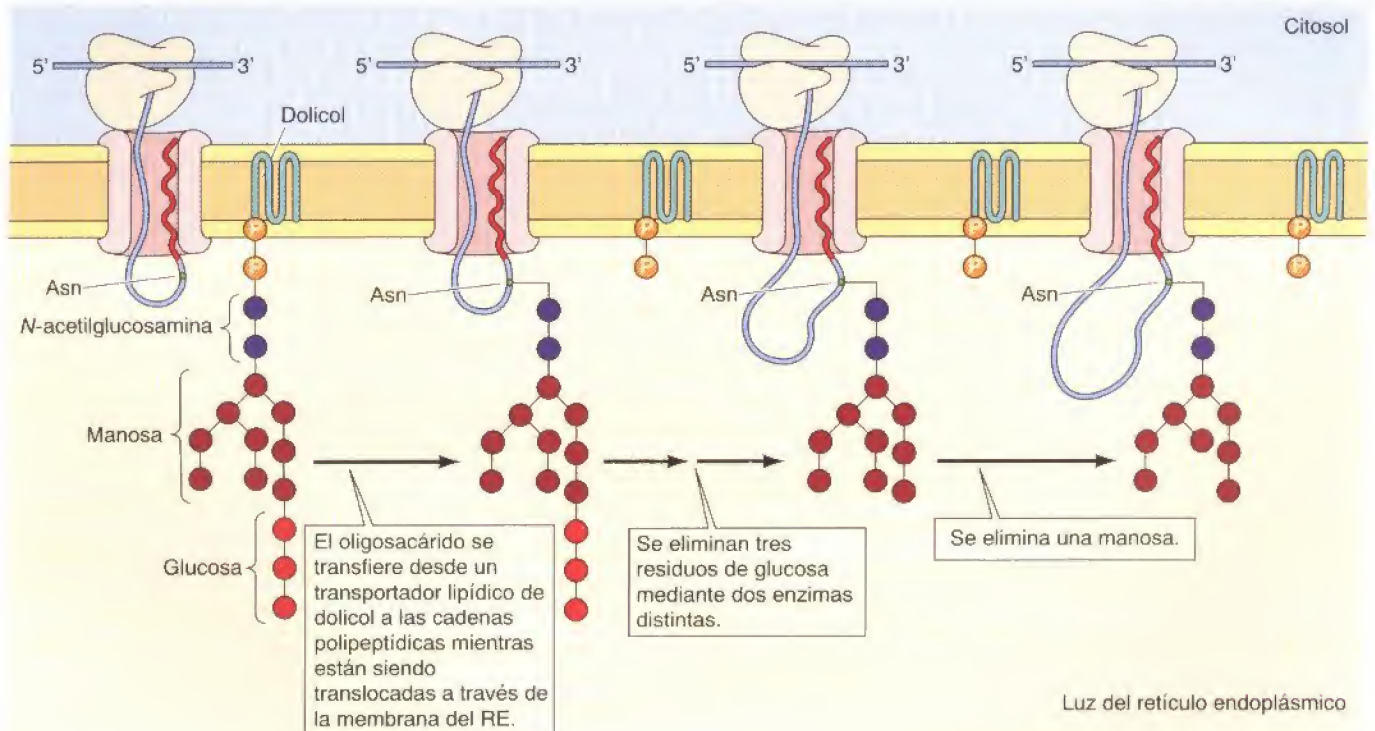



*Figura 9.14*
**Plegamiento de proteínas en el RE.** La chaperona molecular BiP se une a las cadenas polipeptídicas cuando atraviesan la membrana del RE y favorece el plegamiento y el ensamblaje de proteínas en el RE.

Algunas proteínas se anclan a la membrana plasmática mediante glicolípidos en lugar de mediante regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la membrana. Debido a que estos glicolípidos anclados a la membrana contienen fosfatidilinositol, se denominan **anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI)** cuya estructura se muestra en la Figura 7.32. Los anclajes de GFI se ensamblan en la membrana del RE. Se unen inmediatamente después de completarse la síntesis de las proteínas, al residuo carboxilo terminal de algunas proteínas ancladas en la membrana por una región C-terminal que atraviesa la membrana (Fig. 9.16). La región transmembrana de la proteína se intercambia por el anclaje de GFI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la membrana sólo a través del glicolípido. Al igual que las proteínas transmembrana, son transporta-

*Figura 9.15*
**Glicosilación de proteínas en el RE.**



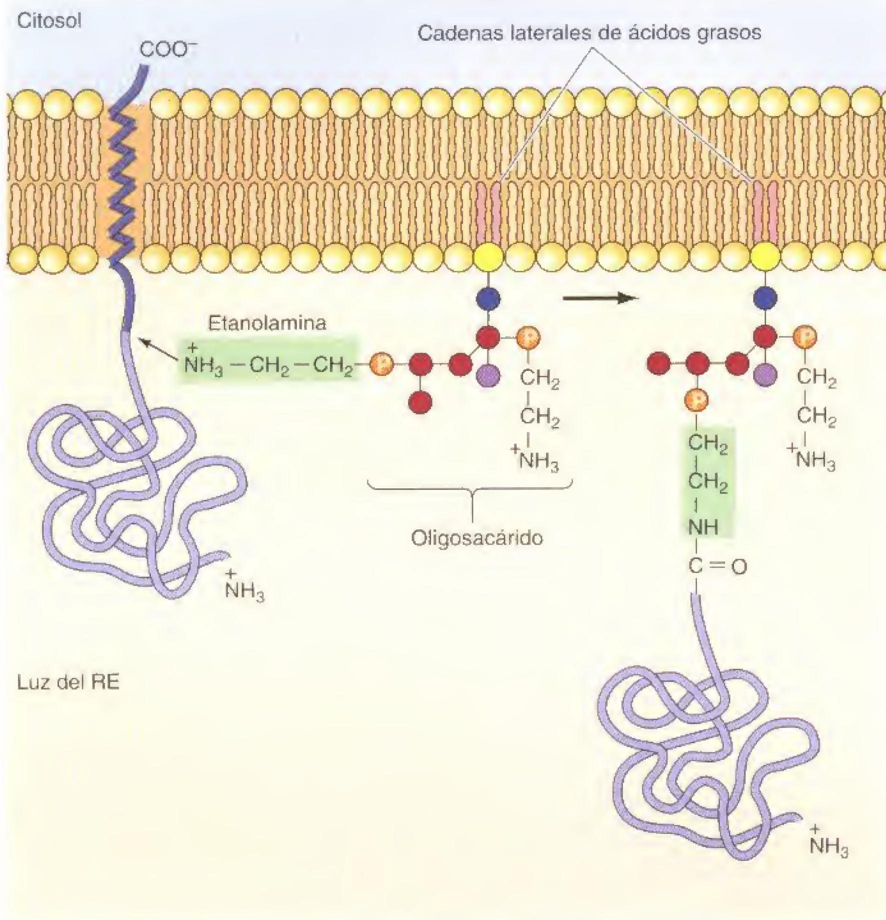



*Figura 9.16*

**Unión de los anclajes de GFI.** Los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GFI) contienen dos cadenas de ácidos grasos, un resto oligosacárido constituido por inositol y otros azúcares, y etanolamina (véase Fig. 7.32 para una estructura más detallada). Los anclajes de GFI se ensamblan en el RE y se unen a los polipéptidos anclados en la membrana por una región carboxilo terminal que atraviesa la membrana. La región que atraviesa la membrana se escinde, y el nuevo extremo carboxilo terminal se une al grupo $NH_2$ de la etanolamina inmediatamente después de que haya finalizado la traducción, dejando a la proteína unida a la membrana mediante el anclaje de GFI.

das a la superficie celular como componentes de la membrana a través de la vía secretora. Su orientación en el RE determina que las proteínas ancladas al GFI sean expuestas hacia el exterior de la célula, permaneciendo unidas a la membrana a través del anclaje de GFI.

Posiblemente hasta la mitad de las proteínas sintetizadas en el RE son degradadas en menos de 20 minutos, principalmente porque no se pliegan correctamente. Así, un papel importante del RE es identificar las proteínas mal plegadas, marcarlas y dirigirlas a la vía de degradación. Puesto que ayudan a las proteínas a plegarse correctamente, las chaperonas y las enzimas del procesamiento proteico presentes en el lumen del RE a menudo actúan como sensores de proteínas plegadas incorrectamente. El proceso de control de calidad de proteínas del RE no se conoce por completo, pero los papeles que juegan las chaperonas glicoproteicas, **calnexina** y **calreticulina** (Fig. 9.17), son bastante conocidos. Estas proteínas unen residuos de azúcar presentes en las glicoproteínas parcialmente plegadas antes de que se complete la translocación y facilitan el correcto plegamiento de las glicoproteínas. Si la glicoproteína es incapaz de plegarse tras múltiples ciclos, el complejo de la chaperona lo enviará a una vía de degradación que implica la retrotranslocación de la cadena proteica a través del canal del translocón. En el citosol será marcada por ubiquitinación y degradada en el proteasoma como se describió en el Capítulo 7.

## *RE liso y síntesis de lípidos*

Además de su actividad en el procesamiento de las proteínas secretadas y de membrana, el RE es el sitio principal en el que se sintetizan los lípidos de la membrana en las células eucariotas. Puesto que son extremadamente hidrófobos, los lípidos se sintetizan asociados con membranas celulares ya existentes,

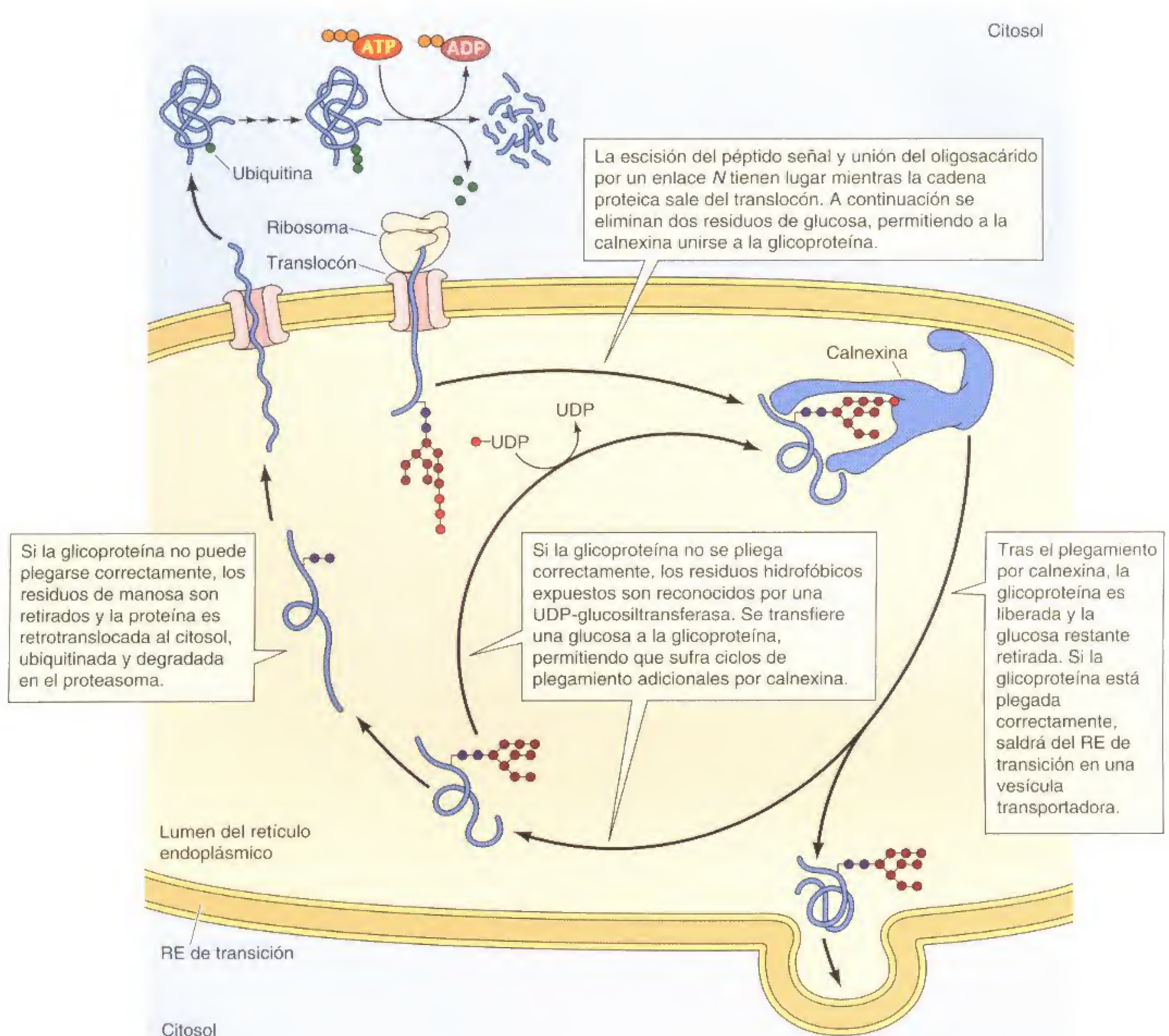



*Figura 9.17*
**Plegamiento de glicoproteínas por la calnexina.**

en lugar de hacerlo en el ambiente acuoso del citosol. Aunque algunos lípidos se sintetizan asociados con otras membranas, la mayoría se sintetizan en el RE. Después son transportados, en vesículas o mediante proteínas transportadoras, desde el RE a sus destinos finales, como se tratará posteriormente en este Capítulo y en el Capítulo 10.

Las membranas de las células eucariotas están compuestas por tres tipos fundamentales de lípidos: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. La mayoría de los fosfolípidos, que son los componentes estructurales básicos de la membrana, derivan del glicerol. Son sintetizados en la cara citoplásmica de la membrana del RE, a partir de precursores citosólicos hidrosolubles (Fig. 9.18). En primer lugar los ácidos grasos se transfieren desde los transportadores de coenzima A al glicerol-3-fosfato mediante una enzima unida a la membrana, y el fosfolípido resultante (ácido fosfatídico) se inserta en la membrana. Las enzimas en la cara citoplásmica de la membrana del RE catalizan a continuación la adición de diferentes grupos de cabeza polares, dando lugar a la fosfatidilcolina,

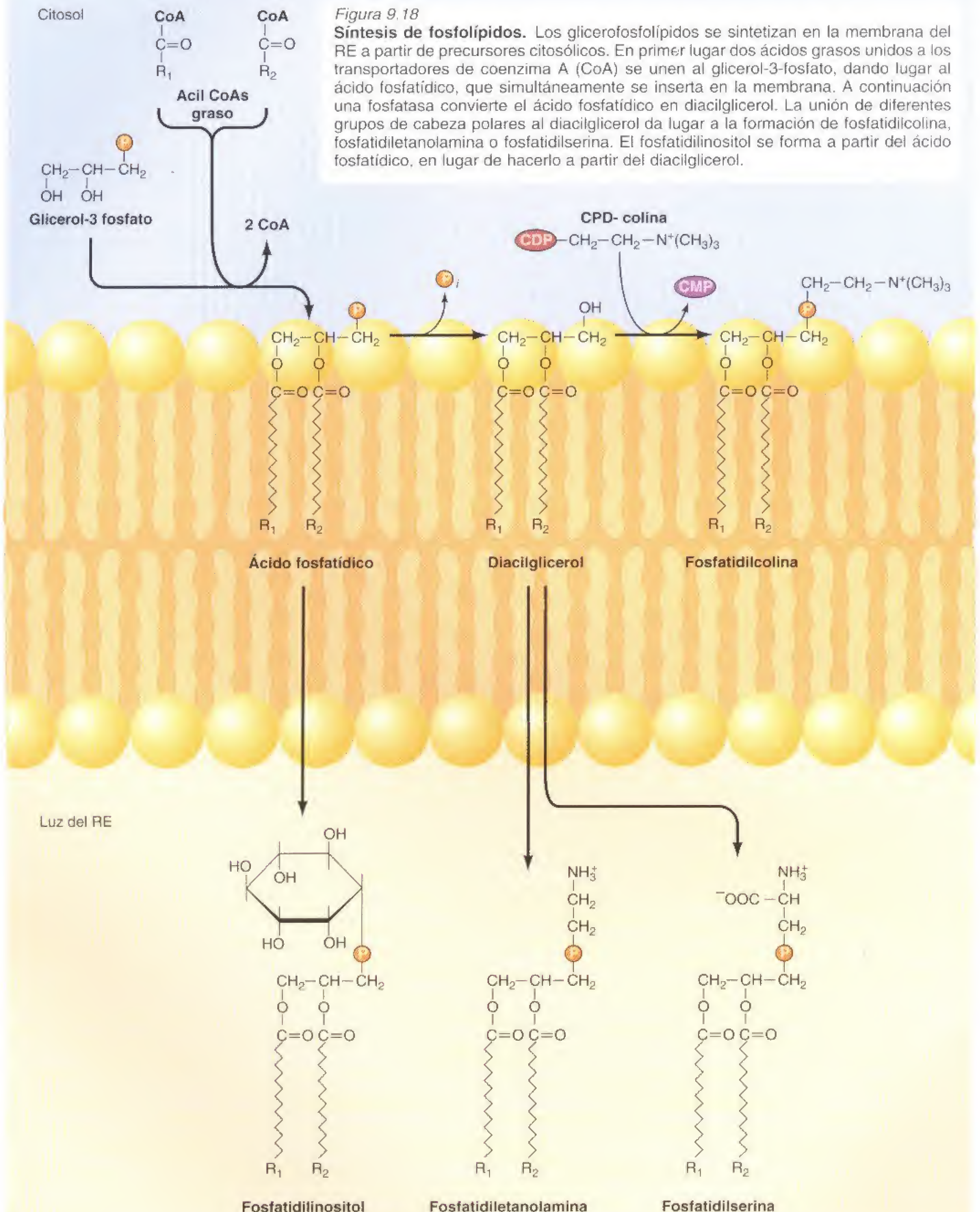



*Figura 9.18*

**Síntesis de fosfolípidos.** Los glicerofosfolípidos se sintetizan en la membrana del RE a partir de precursores citosólicos. En primer lugar dos ácidos grasos unidos a los transportadores de coenzima A (CoA) se unen al glicerol-3-fosfato, dando lugar al ácido fosfatídico, que simultáneamente se inserta en la membrana. A continuación una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol. La unión de diferentes grupos de cabeza polares al diacilglicerol da lugar a la formación de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina. El fosfatidilinositol se forma a partir del ácido fosfatídico, en lugar de hacerlo a partir del diacilglicerol.

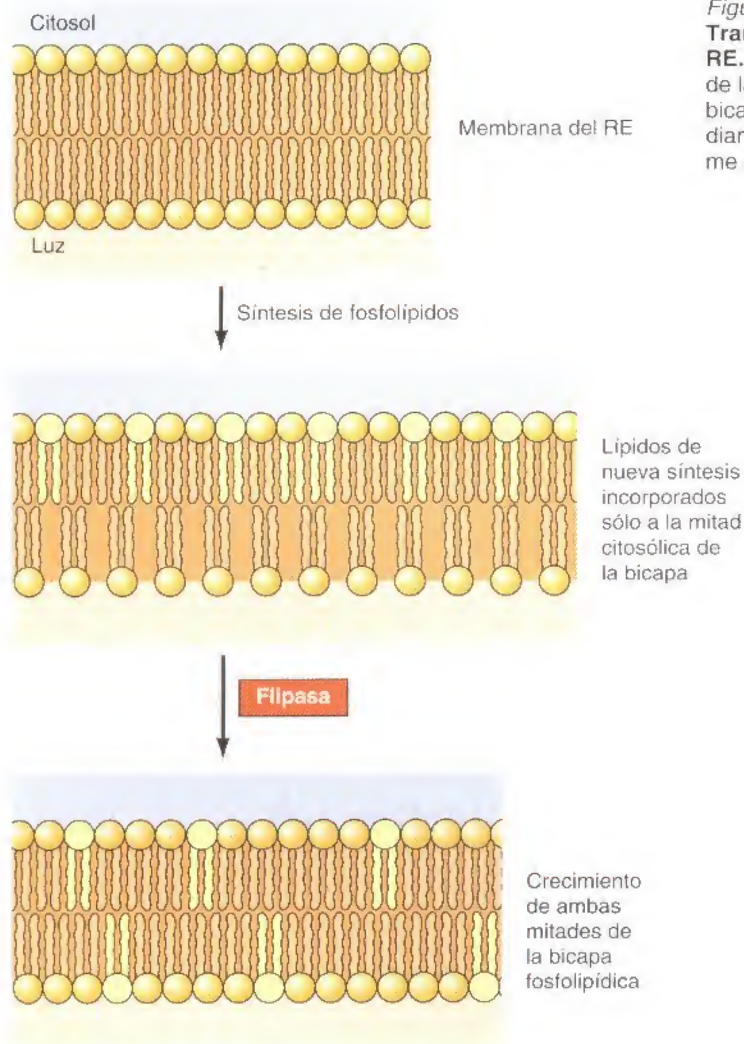



*Figura 9.19*
**Translocación de los fosfolípidos a través de la membrana del RE.** Puesto que los fosfolípidos se sintetizan en la cara citosólica de la membrana del RE, sólo se añaden a la mitad citosólica de la bicapa. Posteriormente se translocan a través de la membrana mediante flipasas fosfolipídicas, dando lugar a un crecimiento uniforme de las dos mitades de la bicapa fosfolipídica.

fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, o fosfatidilinositol.

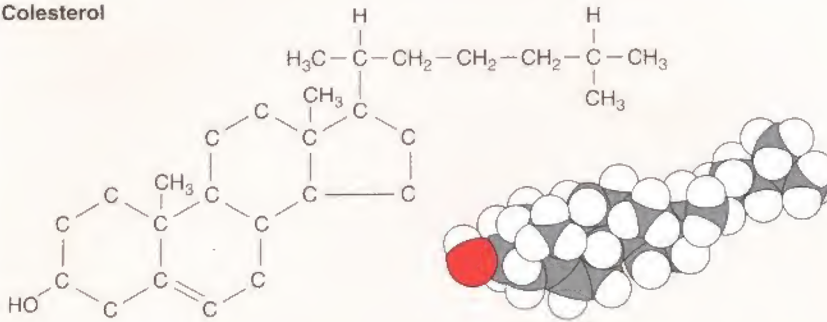
La síntesis de estos fosfolípidos en la cara citoplásmica de la membrana del RE permite que las cadenas hidrófobas de los ácidos grasos permanezcan ocultas en la membrana mientras que las enzimas unidas a la membrana catalizan sus reacciones con precursores hidrosolubles (p. ej., CDP-colina) en el citosol. Sin embargo, y debido a esta topografía, los fosfolípidos nuevos sólo se añaden a la mitad citosólica de la membrana del RE (Fig. 9.19). Para mantener una membrana estable, algunos de estos fosfolípidos de nueva síntesis deben transferirse a la otra mitad (la de la luz) de la bicapa del RE. Esta transferencia no tiene lugar espontáneamente ya que requiere el paso de un grupo polar a través de la membrana. Por el contrario, las proteínas de membrana denominadas **flipasas** catalizan la translocación rápida de fosfolípidos a través de la membrana del RE, dando lugar a un crecimiento uniforme de las dos partes de la bicapa.

Además de su papel en la síntesis de los glicerofosfolípidos, el RE también es el lugar principal de la síntesis de otros dos lípidos de membrana: colesterol y ceramida (Fig. 9.20). Como se tratará posteriormente, la ceramida se convierte en glicolípidos o esfingomielina (el único fosfolípido de membrana que no deriva del glicerol) en el aparato de Golgi. Por lo tanto, el RE es el responsable de la síntesis de los productos finales o de los precursores de todos los lípidos principales de las membranas eucariotas. El colesterol y la esfingomielina son componentes importantes de las balsas o *rafts* lipídicas, como se estudia en el Capítulo 12.

El RE liso es abundante en las células que son particularmente activas en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, las hormonas esteroideas se sintetizan (a partir del colesterol) en el RE, por lo que se encuentra una gran cantidad de RE liso en las células que producen esteroides, como las de los testículos y del ovario. Además, el RE liso es abundante en el hígado, donde contiene enzimas que metabolizan varios compuestos liposolubles. Estas enzimas desintoxicantes inactivan un número importante de drogas potencialmente nocivas (p. ej., fenobarbital), convirtiéndolas en compuestos hidrosolubles que pueden eliminarse del cuerpo a través de la orina. Por lo tanto, el RE liso está implicado en múltiples aspectos del metabolismo de los lípidos y de los compuestos liposolubles.

## *Exportación de proteínas y lípidos desde el RE*

Tanto las proteínas como los lípidos migran a través de la vía secretora en vesículas de transporte, que se originan por gemación en la membrana de un



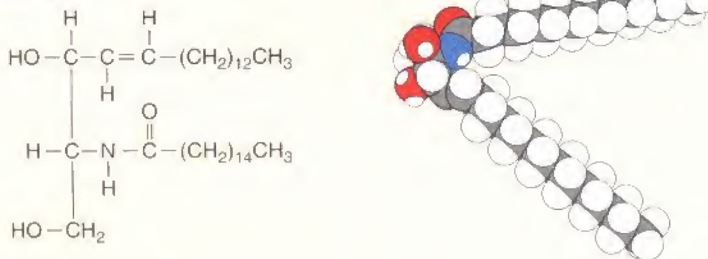




*Figura 9.20*
**Estructura del colesterol y de la ceramida.** No se muestran los hidrógenos unidos a los carbonos de los anillos del colesterol.

orgánulo y se funden posteriormente con la membrana de otro. Así, las moléculas son exportadas desde el RE en vesículas que se originan por gemación en el RE y que, en primer lugar, transportan su contenido al compartimento intermedio RE-Golgi y después al aparato de Golgi (Fig. 9.21). Pasos posteriores en la vía secretora suponen el transporte de vesículas entre compartimentos diferentes del Golgi y desde el Golgi a los lisosomas o a la membrana plasmática. En cada caso, las proteínas en la luz de un orgánulo se empaquetan en una vesícula de transporte que se va a escindir por gemación, y después se liberan en la luz del orgánulo receptor tras la fusión de la vesícula. Las proteínas de membrana y los lípidos se transportan de forma similar, y es digno de mencionar que su orientación topológica se mantiene al viajar desde un orgánulo rodeado por membrana a otro. Por ejemplo, los dominios de una proteína expuestos en la cara citosólica de la membrana del RE también estarán expuestos en la cara citosólica de las membranas del Golgi y plasmática, mientras que los dominios de una proteína expuestos en la cara luminal de la membrana del RE estarán expuestos en la cara luminal del Golgi y al exterior de la célula (véase Fig. 9.10).

Mientras que la mayoría de las proteínas viajan desde el RE al Golgi, algunas proteínas han de retenerse en el RE en lugar de continuar a lo largo de la vía secretora. Concretamente, las proteínas que realizan su función en el RE (incluyendo BiP, la peptidasa señal, la proteína disulfuro isomerasa, y otras enzimas tratadas previamente), deben retenerse en el interior de dicho orgánulo. Por lo tanto, ser exportadas al Golgi frente a ser retenidas en el RE es la primera disyuntiva con la que se encuentran las proteínas que están siendo distribuidas a sus destinos correctos en la vía secretora. Un cruce de caminos similar aparece en cada paso posterior del transporte, como la retención en el Golgi frente a la exportación a los lisosomas o a la membrana plasmática. En cada caso, unas señales específicas de localización dirigen a las proteínas a sus destinos intracelulares correctos.

La distinción entre las proteínas que han de ser exportadas desde el RE y aquéllas que son retenidas en él parece que se produce por dos tipos diferentes de secuencias directoras que marcan específicamente a las proteínas como

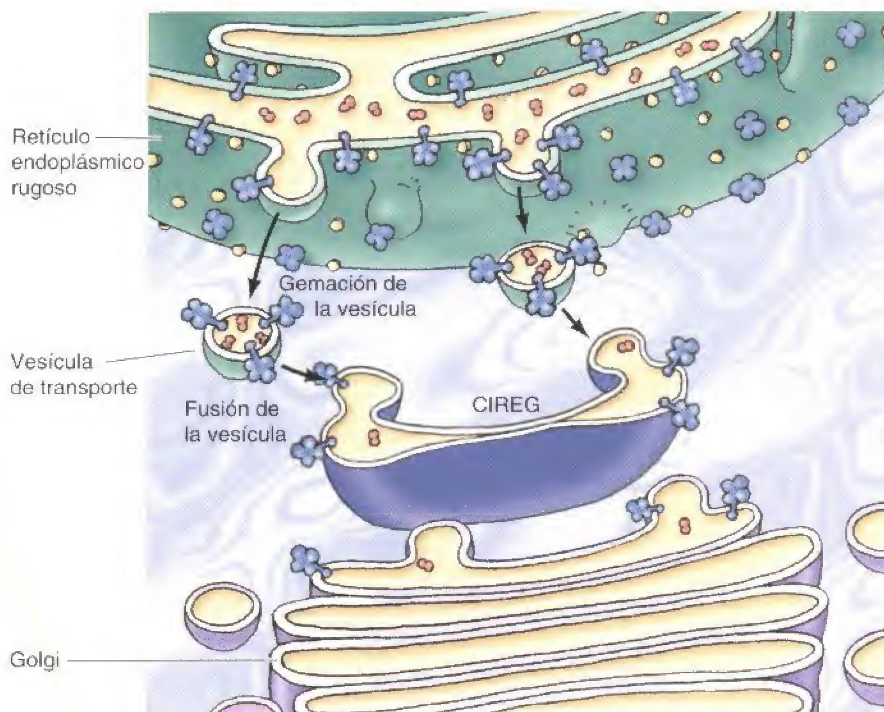



*Figura 9.21*
**Transporte de vesículas desde el RE hasta el Golgi.** Las proteínas y los lípidos se transportan desde el RE hasta el Golgi en vesículas de transporte que se originan por gemación de la membrana del RE y después se fusionan para formar las vesículas y los túbulos del compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG). Las proteínas luminales del RE son captadas por las vesículas y liberadas en la luz del Golgi. Las proteínas de membrana mantienen la misma orientación en el Golgi que en el RE.

aquellas (1) destinadas para el transporte al Golgi o (2) destinadas para la retención en el RE. Muchas proteínas se retienen en la luz del RE debido a la presencia de la secuencia marcadora Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL, en el código de una única letra) en su extremo carboxilo terminal. Si esta secuencia se deleciona en una proteína que normalmente se retiene en el RE (p. ej., BiP), la proteína mutada es transportada al Golgi y secretada de la célula. Por el contrario, la adición de la secuencia KDEL al extremo carboxilo terminal de las proteínas que normalmente son secretadas hace que sean retenidas en el RE. La retención de algunas proteínas transmembrana en el RE está dictada de una manera similar por secuencias C-terminales cortas que contienen dos residuos de lisina (secuencias KKXX).

Es interesante destacar que las señales KDEL y KKXX no impiden que las proteínas solubles del RE sean empaquetadas en vesículas y transportadas al Golgi. Lo que sucede es que estas señales provocan que las proteínas residentes en el RE sean recuperadas selectivamente del compartimento intermedio RE-Golgi o del complejo de Golgi y devueltas al RE a través de una vía de reciclado (Fig. 9.22). Las proteínas que portan las secuencias KDEL y KKXX parece que se unen a receptores específicos para el reciclado en la membrana de estos compartimentos y posteriormente son transportadas selectivamente de vuelta hacia el RE.

Las secuencias KDEL y KKXX son las señales de retención/recuperación mejor caracterizadas, pero pueden existir otras. Adicionalmente, parece que algunas proteínas destinadas para la secreción están marcadas por señales que dirigen activamente su exportación desde el RE. Así, todavía no está claro si existe una vía por defecto a la que se dirigen proteínas sin marcar al Golgi, o si todas las proteínas son seleccionadas específicamente para su retención o exportación del RE.

## Aparato de Golgi

El **aparato de Golgi, o el complejo de Golgi,** funciona como una fábrica en la que las proteínas recibidas desde el RE se reprocesan y distribuyen para

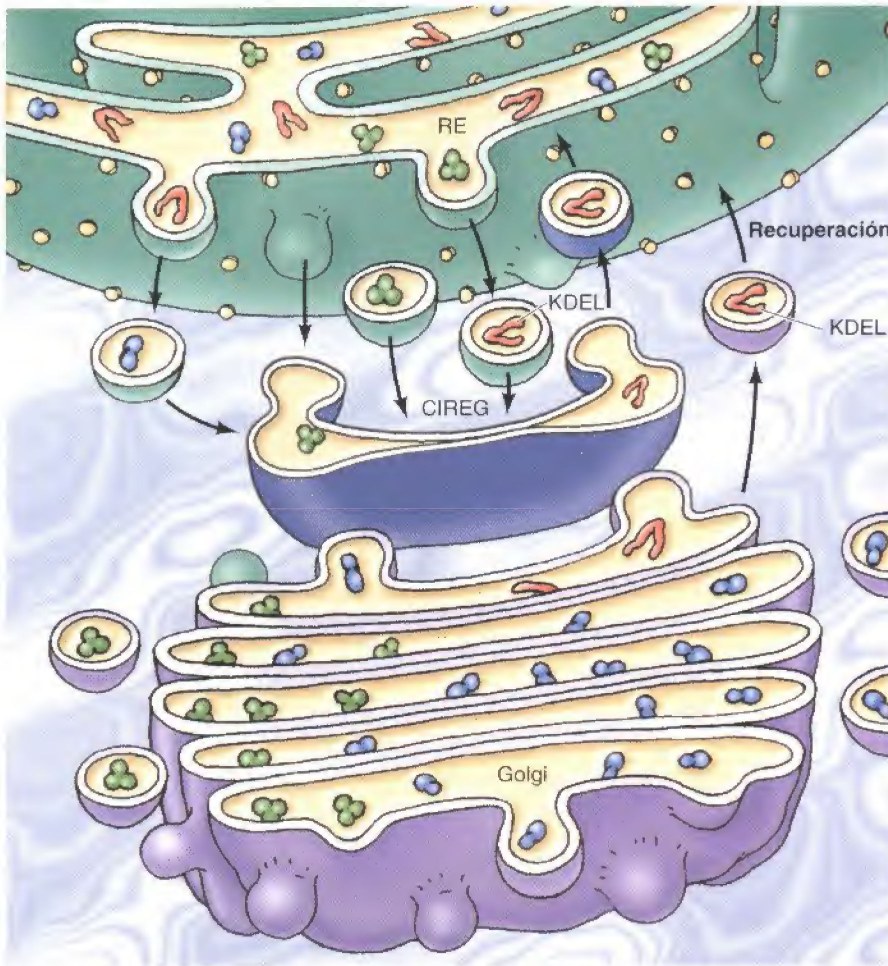


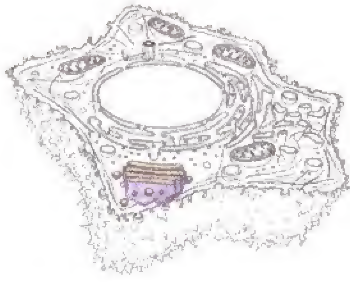

*Figura 9.22*
**Recuperación de las proteínas residentes en el RE.** Las proteínas destinadas a permanecer en la luz del RE se encuentran marcadas por la secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) en su extremo carboxilo terminal. Estas proteínas son exportadas desde el RE al Golgi por el flujo masivo no selectivo de proteínas a través de la vía secretora, pero son reconocidas por un receptor en el compartimento intermedio RE-Golgi (CIREG) o en el aparato de Golgi y son devueltas selectivamente al RE.

ser transportadas a sus destinos finales: los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Además, como ya se ha mencionado, los glicolípidos y la esfingomielina son sintetizados en el Golgi. En las células vegetales, el aparato de Golgi, además, es el sitio en el que se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Así el aparato de Golgi está implicado en procesar el amplio espectro de constituyentes celulares que viajan a lo largo de la vía secretora.

## *Organización del Golgi*

Morfológicamente el Golgi está compuesto por unas bolsas aplanadas, rodeadas de membrana (cisternas) y por vesículas asociadas (Fig. 9.23). Un aspecto llamativo del aparato de Golgi es su polaridad tanto en la estructura como en la función. Las proteínas procedentes del RE entran por su cara *cis* (cara de entrada), que es convexa y habitualmente se orienta hacia el núcleo. Entonces son transportadas a través del Golgi y salen por su cara cóncava *trans* (cara de salida). Según atraviesan el Golgi, las proteínas se modifican y se distribuyen para el transporte a sus destinos finales en la célula.

Los diferentes procesos de procesamiento y distribución de las proteínas parece que tienen lugar en una secuencia ordenada en diferentes regiones del complejo de Golgi, por lo que se suele considerar que el Golgi está constituido por múltiples compartimentos diferenciados. Aunque no se ha establecido el número de tales compartimentos, normalmente se considera que el Golgi está constituido por cuatro regiones funcionalmente diferentes: la **red *cis* del Golgi,**



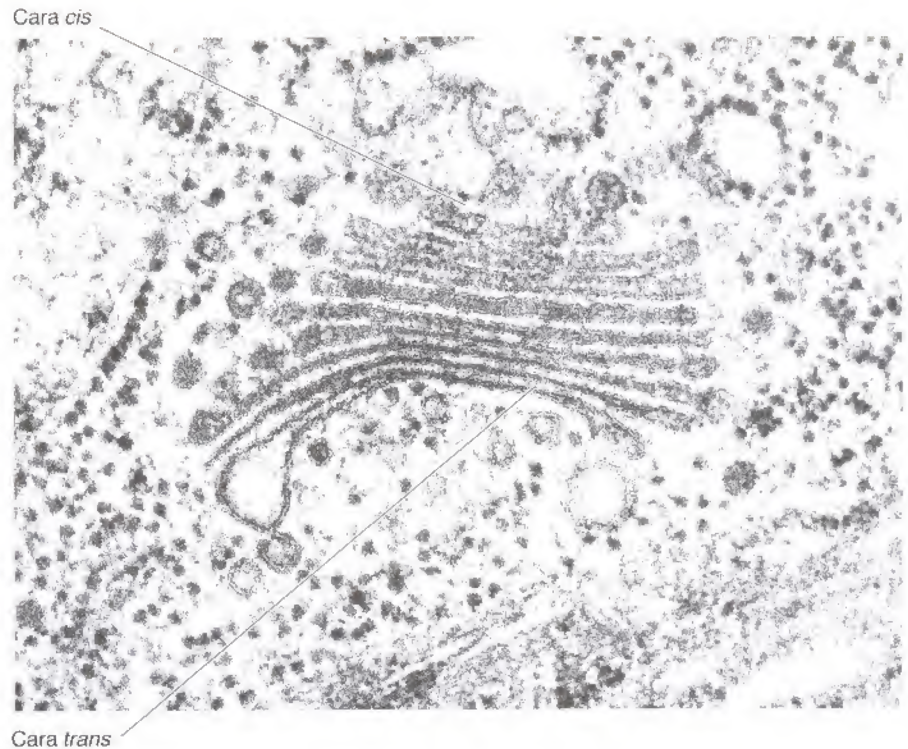



*Figura 9.23*
**Microfotografía electrónica de un aparato de Golgi.** El aparato de Golgi está constituido por una pila de cisternas aplanadas y vesículas asociadas. Las proteínas y lípidos procedentes del RE entran en el aparato de Golgi por su cara *cis* y salen por su cara *trans* (Cortesía del Dr L. Andrew Staehelin, Universidad de Colorado en Boubler).

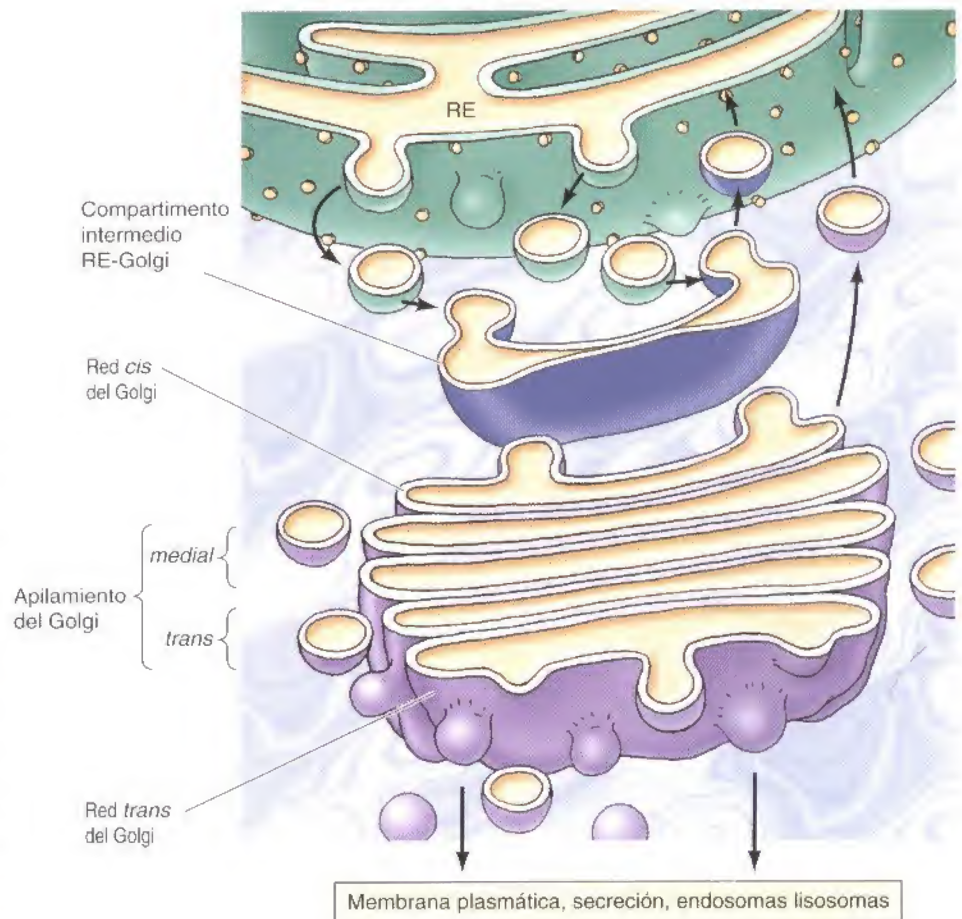



*Figura 9.24*
**Regiones del aparato de Golgi.** Las vesículas procedentes del RE se fusionan para formar el compartimento intermedio RE-Golgi, y entonces las proteínas del RE se transportan a la red *cis* del Golgi. Las proteínas residentes en el RE son devueltas desde el compartimento intermedio RE-Golgi y desde la red *cis* del Golgi a través de la vía de reciclaje. Los compartimentos *medial* y *trans* del apilamiento del Golgi se corresponden con las cisternas de la porción medial del complejo de Golgi y son los lugares donde se producen la mayoría de las modificaciones de las proteínas. Las proteínas se transportan después a la red *trans* del Golgi, donde se distribuyen para el transporte a la membrana plasmática, para ser secretadas, o hacia los lisosomas.

el **apilamiento del Golgi** (que se divide en los subcompartimentos *medial* y *trans*) la **red *trans* del Golgi** (Fig. 9.24). Las proteínas procedentes del RE se transportan al compartimento intermedio RE-Golgi y entran a continuación en el aparato de Golgi por la red *cis* del Golgi. Posteriormente pasan a los compartimentos *medial* y *trans* del apilamiento del Golgi, donde tienen lugar la mayor parte de las actividades metabólicas del aparato de Golgi. Las proteínas modificadas, los lípidos y los polisacáridos migran a continuación a la red *trans* del Golgi, que actúa como un centro de organización y distribución, dirigiendo el tráfico molecular a los lisosomas, a la membrana plasmática, o al exterior de la célula.

Aunque el aparato de Golgi se describió por primera vez hace más de 100 años, el mecanismo por el que las proteínas se desplazan a través del aparato de Golgi aún no ha sido establecido y es un área de controversia entre los biólogos celulares. Una posibilidad es que sean unas vesículas de transporte las que lleven las proteínas entre una cisterna y otra de los compartimentos del Golgi. Sin embargo, un modelo alternativo que se apoya en una evidencia experimental considerable propone que las proteínas se transportan a través de los compartimentos del Golgi dentro de las cisternas del Golgi, que van madurando y se desplazan progresivamente a través del Golgi en una dirección *cis-trans*. Es probable que el transporte tenga lugar mediante ambos procesos. Trabajos recientes sugieren que la estructura dinámica del Golgi se mantiene mediante interacciones de proteínas presentes en las membranas de las cisternas con el citoesqueleto.

### *Glicosilación de proteínas en el Golgi*

El procesamiento de las proteínas en el Golgi supone la modificación y síntesis de los restos de carbohidratos de las glicoproteínas. Uno de los aspectos principales de este procesamiento es la modificación de los *N*-oligosacáridos que se unieron a las proteínas en el RE. Como ya se ha tratado en este Capítulo, las proteínas se modifican en el RE al añadírseles un oligosacárido constituido por 14 residuos de azúcar (véase Fig. 9.15). Seguidamente se eliminan tres residuos de glucosa y una manosa mientras los polipéptidos aún están en el RE. Tras el transporte al aparato de Golgi, los *N*-oligosacáridos de estas glicoproteínas sufren diversas modificaciones posteriores.

Los *N*-oligosacáridos se procesan en el aparato de Golgi mediante una secuencia ordenada de reacciones (Fig. 9.25). La primera modificación de las proteínas destinadas a ser secretadas o a la membrana plasmática, es la eliminación de otros tres residuos de manosa. A esto le sigue la adición secuencial de una *N*-acetilglucosamina, la eliminación de dos manosas más, y la adición de una fucosa y de otras dos *N*-acetilglucosaminas. Finalmente, se añaden tres galactosas y tres residuos de ácido siálico. Como se mencionó en el Capítulo 7, las distintas glicoproteínas se modifican de forma diferente durante su paso a través del Golgi, dependiendo tanto de la estructura de la proteína como de la cantidad de enzimas implicadas en el proceso presentes en el complejo de Golgi de los diferentes tipos de células. Por consiguiente, las proteínas pueden salir del Golgi con diversos *N*-oligosacáridos.

El procesamiento del *N*-oligosacárido de las proteínas lisosómicas difiere del de las proteínas secretadas y de la membrana plasmática. Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas, en vez de la eliminación inicial de tres residuos de manosa, son modificadas mediante una fosforilación de la manosa. En el primer paso de esta reacción, se añade *N*-acetilglucosamina fosfato a residuos específicos de manosa, probablemente mientras la proteína aún está en la red *cis* del Golgi (Fig. 9.26). A esto le sigue la eliminación del grupo *N*-acetilglucosamina, dejando residuos de **manosa-6-fosfato** en el *N*-oligosacárido. Debido a esta modificación, estos residuos no son eliminados durante el procesamiento posterior. En su lugar, estos restos de manosa fosforilados son

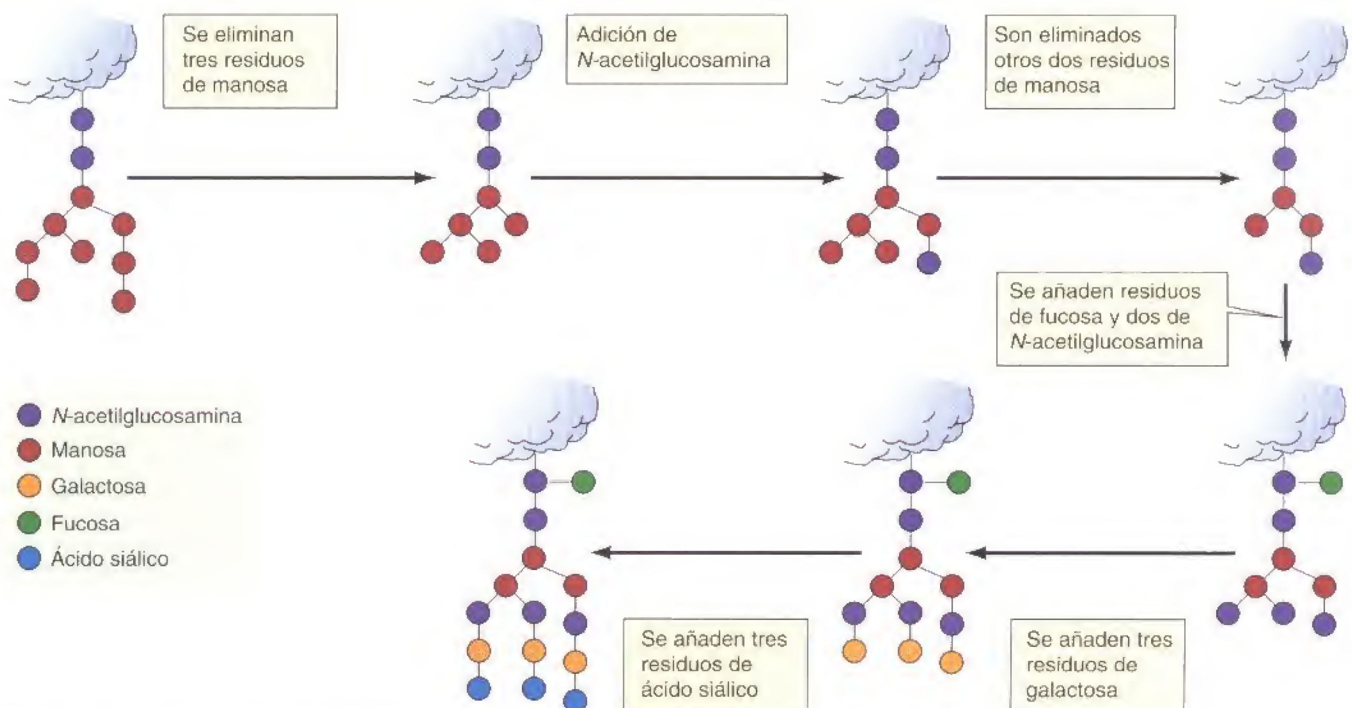



*Figura 9.25*
**Procesamiento de los *N*-oligosacáridos en el Golgi.** Los *N*-oligosacáridos de las glicoproteínas transportadas desde el RE son modificados posteriormente mediante una secuencia ordenada de reacciones en el Golgi.

reconocidos específicamente por un receptor de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi, que dirige el transporte de estas proteínas a los lisosomas.

Por lo tanto, la fosforilación de los residuos de manosa es un paso crucial en la distribución de las proteínas lisosómicas hacia su destino intracelular correcto. La especifidad de este proceso reside en la enzima que cataliza el primer paso en la secuencia de la reacción —la adición selectiva de *N*-acetilglucosamina fosfato a las proteínas lisosómicas—. Esta enzima reconoce un determinante estructural que está presente en las proteínas lisosómicas pero no en las proteínas destinadas a la membrana plasmática o a la secreción. Este determinante de reconocimiento no es una simple secuencia de aminoácidos, sino que está constituido, en la proteína plegada, por la yuxtaposición de secuencias de aminoácidos de regiones diferentes de la cadena polipeptídica. A diferencia de las secuencias señal que dirigen la translocación de proteínas al RE, el determinante de reconocimiento que conduce a la fosforilación de la manosa, y que por tanto dirige finalmente las proteínas a los lisosomas, depende de la conforma-

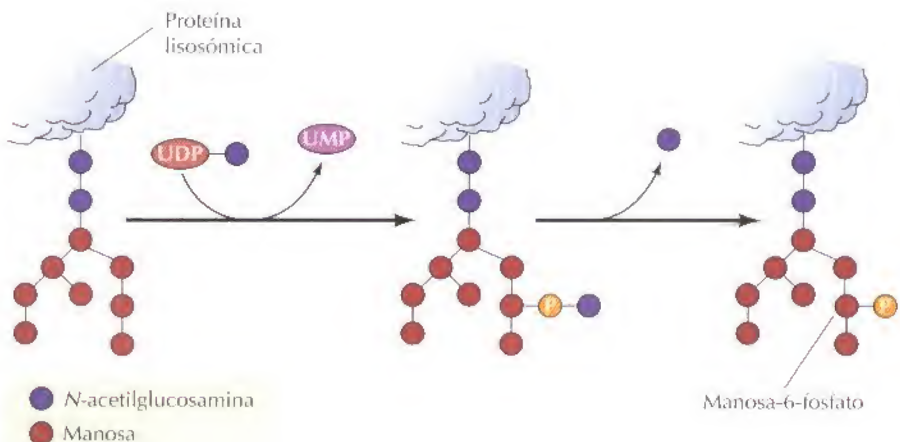



*Figura 9.26*
**Marcaje y dirección de las proteínas lisosómicas mediante la fosforilación de los residuos de manosa.** Las proteínas destinadas a incorporarse en los lisosomas son reconocidas y modificadas específicamente mediante la adición de grupos fosfato a la posición 6 de los residuos de manosa. En el primer paso de la reacción, los fosfatos de *N*-acetilglucosamina se transfieren a los residuos de manosa desde la UDP-*N* acetilglucosamina. A continuación se eliminan los grupos *N*-acetilglucosamina dando lugar a manosa-6-fosfato.

ción tridimensional de la proteína plegada. Estos determinantes se denominan **regiones señal**, a diferencia de las señales lineales tratadas previamente en este capítulo.

Las proteínas también pueden modificarse mediante la adición de carbohidratos a las cadenas laterales de residuos de serina y treonina que formen parte de secuencias específicas (*O*-glicosilación) (véase Fig. 7.28). Estas modificaciones tienen lugar en el aparato de Golgi mediante la adicion secuencial de residuos únicos de azúcar. La serina o la treonina se suelen unir directamente a la *N*-acetilgalactosamina, a la que después pueden añadirse otros azúcares. En algunos casos, estos azúcares sufren modificaciones posteriores por la adición de grupos sulfato.

## *Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi*

Además de procesar y distribuir las glicoproteínas, el aparato de Golgi participa en el metabolismo lipídico —concretamente, en la síntesis de glicolípidos y esfingomielina. Como ya se ha visto, los glicerofosfolípidos, el colesterol, y la ceramida se sintetizan en el RE. La esfingomielina y los glicolípidos se sintetizan a partir de la ceramida en el aparato de Golgi (Fig. 9.27). La esfingomielina (el único fosfolípido no glicérico en las membranas celulares) es sintetizada por la transferencia de un grupo fosforilcolina desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, la adición de carbohidratos a la ceramida puede dar lugar a diferentes glicolípidos.

La esfingomielina se sintetiza en la superficie luminal del Golgi, pero la glucosa se añade a la ceramida en la cara citosólica. Sin embargo, parece ser que la glucosilceramida se da la vuelta y los carbohidratos adicionales se añaden en la cara luminal de la membrana. Ni la esfingomielina ni los glicolípidos pueden translocarse a través de la membrana del Golgi, por lo que sólo se localizan en la mitad luminal de la bicapa del Golgi. Tras el transporte vesicular, se localizan en la cara externa de la membrana citoplasmática, con sus grupos de cabeza polares expuestos en la superficie celular. Como se verá en el Capítulo 12, los residuos de oligosacáridos de los glicolípidos son marcadores de superficie importantes en el reconocimiento célula-célula.

En las células vegetales, el aparato de Golgi tiene la función añadida de ser el lugar donde se sintetizan los polisacáridos complejos de la pared celular. Como se tratará con mayor detalle en el Capítulo 12, la pared celular vegetal está compuesta por tres tipos principales de polisacáridos. La celulosa, el constituyente predominante, es un polímero lineal de restos de glucosa. Es sintetizado en la superficie celular por enzimas de la membrana plasmática. Sin embargo, los otros polisacáridos de la pared celular (hemicelulosas y pectinas) son moléculas complejas de cadena ramificada que se sintetizan en el aparato de Golgi y que son

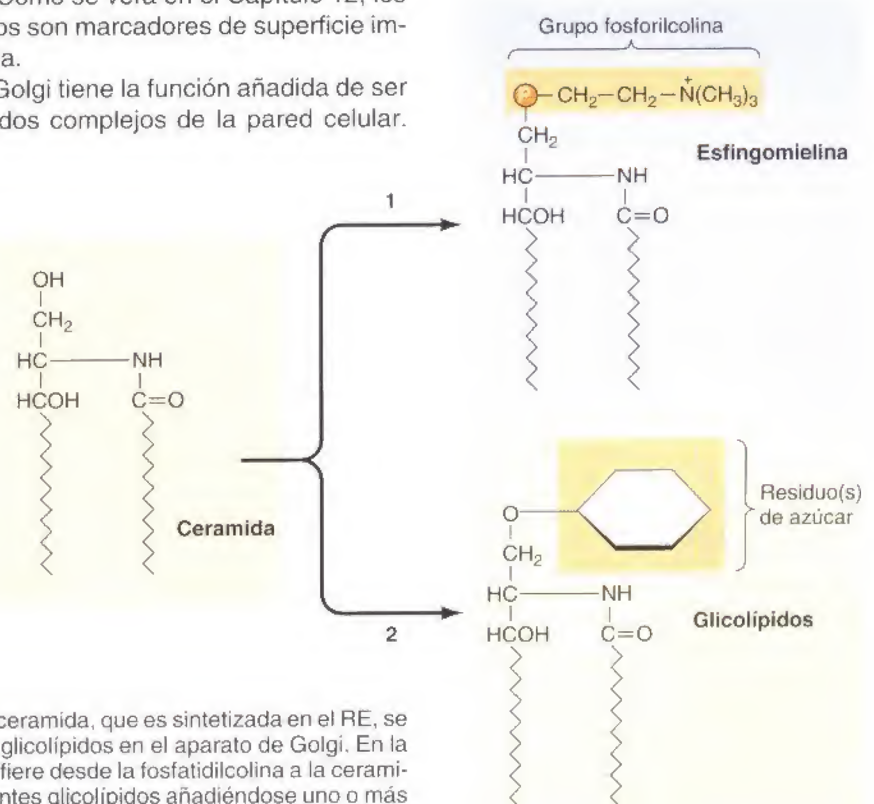



*Figura 9.27*
**Síntesis de esfingomielina y glicolípidos.** La ceramida, que es sintetizada en el RE, se convierte en esfingomielina (un fosfolípido) o en glicolípidos en el aparato de Golgi. En la primera reacción, un grupo fosforilcolina se transfiere desde la fosfatidilcolina a la ceramida. Alternativamente, se pueden sintetizar diferentes glicolípidos añadiéndose uno o más residuos de azúcar (p. ej., glucosa).

transportadas posteriormente en vesículas a la superficie celular. La síntesis de estos polisacáridos de la pared celular es una función principal de la célula, y hasta el 80 % de la actividad metabólica del aparato de Golgi en las células vegetales se dedica a la síntesis de polisacáridos.

### *Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi*

Las proteínas, al igual que los lípidos y los polisacáridos, son transportadas desde el aparato de Golgi a sus destinos finales a través de la vía secretora. Esto implica que las proteínas se distribuyan en diferentes tipos de vesículas de transporte, las cuales saldrán por gemación desde la red *trans* del Golgi y llevarán su contenido hasta la localización celular adecuada. (Fig. 9.27). Algunas proteínas se transportan desde el Golgi a la membrana plasmática por una vía secretora constitutiva, responsable de la incorporación de nuevas proteínas y lípidos a la membrana plasmática, así como de la secreción continua de proteínas desde la célula. Otras proteínas son transportadas a la superficie celular a través de una vía diferente de secreción regulada, o son dirigidas específicamente a otros destinos intracelulares, como los lisosomas en las células animales o las vacuolas en las levaduras.

Las proteínas que realizan su función en el aparato de Golgi deben retenerse en ese orgánulo, en lugar de ser transportadas a través de la vía secretora. A diferencia del RE, todas las proteínas retenidas en el complejo de Golgi están asociadas con la membrana del Golgi en lugar de ser proteínas solubles en su

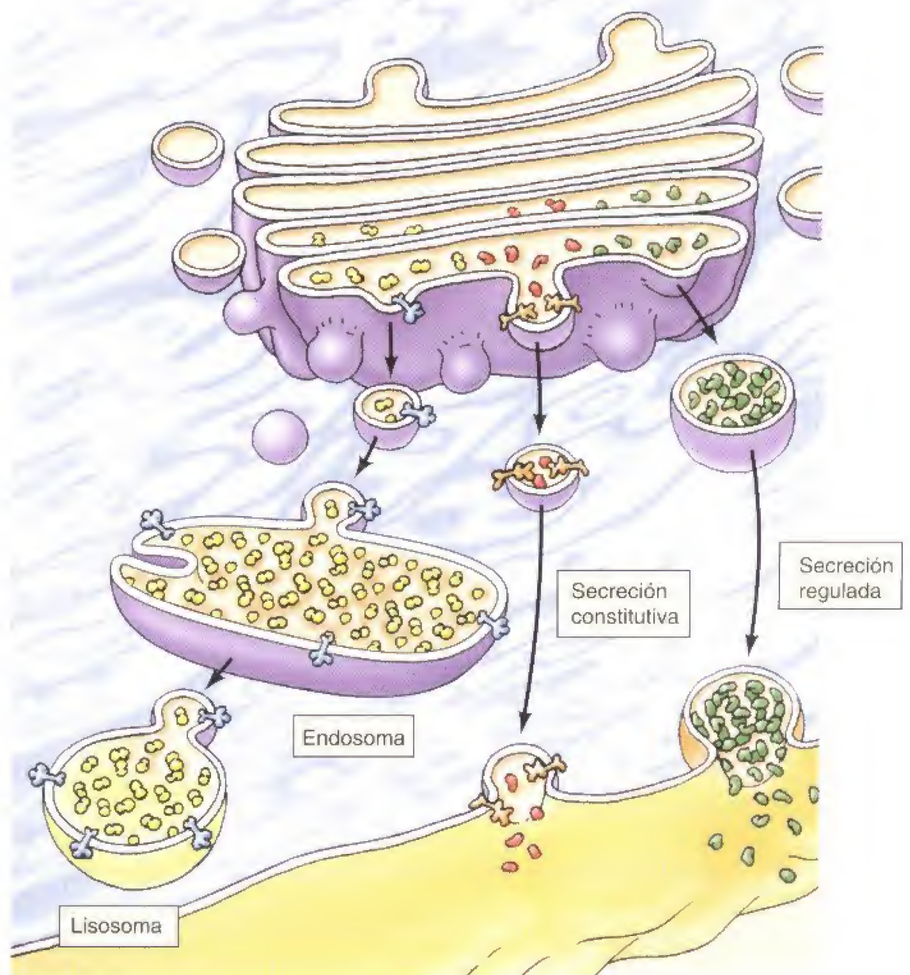



*Figura 9.28*
**Transporte desde el aparato de Golgi.** Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi y se transportan en vesículas a sus destinos finales. En ausencia de señales específicas, las proteínas se transportan a la membrana plasmática mediante la vía secretora constitutiva. De manera alternativa, las proteínas pueden ser desviadas de la vía secretora constitutiva y ser dirigidas a otros destinos, como los lisosomas, o ser secretadas de la célula de una manera regulada.

interior. Las señales responsables para la retención de algunas proteínas en el Golgi se han localizado en sus dominios transmembrana, que retienen las proteínas en el aparato de Golgi impidiendo que sean empaquetadas en las vesículas de transporte que salen por la red *trans* del Golgi. Además, al igual que sucede con las secuencias KKXX de las proteínas de membrana residentes en el RE, las señales en las colas citoplásmicas de algunas proteínas del Golgi son responsables de la recuperación de estas proteínas desde compartimentos posteriores a lo largo de la vía secretora.

La vía secretora constitutiva, que está presente en todas las células, da lugar a una secreción de proteínas continua no regulada. Sin embargo, algunas células también poseen una vía secretora regulada diferente, a través de la que se secretan proteínas específicas en respuesta a señales ambientales. Ejemplos de secreción regulada son la liberación de hormonas desde las células endocrinas, la liberación de neurotransmisores desde las neuronas, y la liberación de enzimas digestivas desde las células acinares pancreáticas que se vio al principio de este capítulo (véase Fig. 9.2). Las proteínas se distribuyen a la vía secretora regulada en la red *trans* del Golgi, donde son empaquetadas en vesículas secretoras especializadas. Estas vesículas secretoras inmaduras, que son más grandes que las vesículas de transporte, procesan aún más su contenido proteico y a menudo se fusionan entre ellas. También almacenan su contenido hasta que señales específicas dirigen su fusión con la membrana plasmática. Por ejemplo, las enzimas digestivas producidas por las células acinares pancreáticas se almacenan en vesículas secretoras hasta que la presencia de comida en el estómago y en el intestino delgado desencadena su secreción. La distribución de las proteínas hacia la vía secretora regulada implica el reconocimiento de regiones señal compartidas por muchas de las proteínas que entran en esta vía. Estas proteínas se acumulan selectivamente en la red *trans* del Golgi y se liberan por la gemación de las vesículas secretoras.

Una complicación adicional en el transporte de las proteínas a la membrana plasmática surge en muchas células epiteliales que se encuentran polarizadas en los tejidos. La membrana plasmática de dichas células se divide en dos regiones distintas, el **dominio apical** y el **dominio basolateral,** que contienen proteínas específicas relacionadas con sus funciones diferenciadas. Por ejemplo, la membrana apical de las células epiteliales del intestino mira hacia la luz del intestino y está especializada en la absorción eficaz de nutrientes; el resto de la célula está rodeada por la membrana basolateral (Fig. 9.29). Los diferentes dominios de la membrana plasmática se encuentran no sólo en las células epiteliales, sino también en otros tipos de células. Por lo tanto, la vía secretora constitutiva debe transportar selectivamente proteínas desde la red *trans* del Golgi a los diferentes dominios de la membrana plasmática. Esto se lleva a cabo mediante el embalaje selectivo de proteínas en, al menos, dos tipos de vesículas secretoras constitutivas que abandonan la red *trans* del Golgi, dirigidas específicamente al dominio apical o al dominio basolateral de la membrana plasmática de la célula. Esto puede ocurrir en la red del *trans* Golgi o en un endosoma.

La vía de distribución de proteínas mejor caracterizada en el Golgi es el transporte selectivo hacia los lisosomas. Como ya se ha visto, las proteínas cuyo destino es el interior de los lisosomas están marcadas con manosa-6-fosfato, que se origina por la modificación de sus *N*-oligosacáridos al poco tiempo de entrar en el aparato de Golgi. Un receptor específico en la membrana de la red *trans* del Golgi reconoce estos residuos de manosa-6-fosfato. Los complejos constituidos por el receptor más la enzima lisosómica se empaquetan en vesículas de transporte destinadas a los lisosomas. Las proteínas cuyo destino es la membrana de los lisosomas están señalizadas por secuencias en sus colas citoplásmicas, en vez de por residuos de manosa-6-fosfato.

En las levaduras y en las células vegetales, que carecen de lisosomas, las proteínas son transportadas desde el aparato de Golgi hacia un destino adicional: **la vacuola** (Fig. 9.29). En estas células, las vacuolas asumen la función de

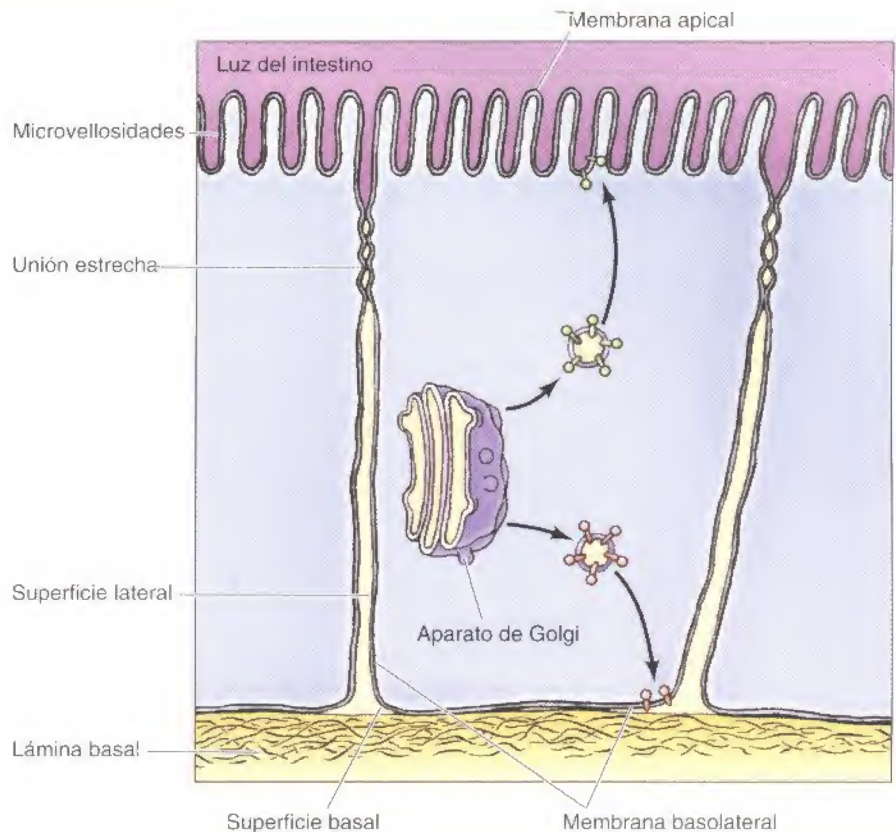
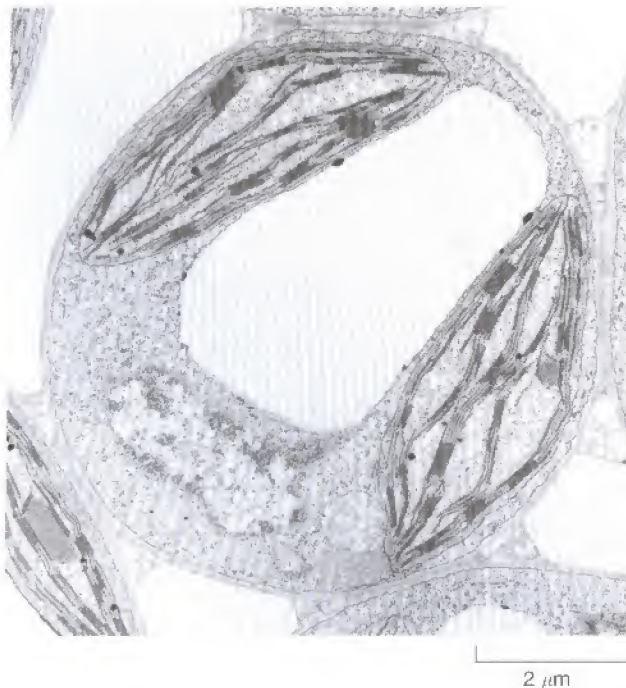



*Figura 9.29*
**Transporte a la membrana plasmática de las células polarizadas.** La membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas se divide en los dominios apical y basolateral. En este ejemplo (epitelio intestinal), la superficie apical de la célula mira hacia la luz del intestino, las superficies laterales están en contacto con las células adyacentes y la superficie basal se apoya en una capa de matriz extracelular (la lámina basal). La membrana apical se caracteriza por la presencia de microvellosidades, que facilitan la absorción de los nutrientes al aumentar la superficie. Las proteínas específicas son dirigidas a la membrana apical o a la membrana basolateral en la red *trans* del Golgi. Las uniones estrechas entre las células adyacentes mantienen la identidad de las membranas apical y basolateral, al impedir la difusión de las proteínas entre estos dominios.

los lisosomas además de realizar otros cometidos, como el almacenamiento de nutrientes y el mantenimiento de la presión de turgencia y del equilibrio osmótico. A diferencia de las proteínas destinadas a los lisosomas, las proteínas se destinan a las vacuolas mediante secuencias peptídicas cortas en lugar de por señales de carbohidratos.

*Figura 9.30*
**Vacuola de una célula vegetal.** La gran vacuola central funciona como un lisosoma además de almacenar nutrientes y mantener el equilibrio osmótico.




## Mecanismo de transporte de las vesículas

Como ha quedado claro en las secciones precedentes de este capítulo, las vesículas de transporte desempeñan un papel central en el tráfico de las moléculas entre los diferentes compartimentos rodeados por membrana de la vía secretora. Como se tratará en el Capítulo 12, las vesículas están implicadas de igual forma en el transporte del material que se ha captado en la superficie celular. El transporte de las vesículas es, por tanto, una actividad celular fundamental, responsable del tráfico molecular entre diversos compartimentos rodeados por membrana, específicos. Por lo tanto, la selectividad de dicho transporte resulta clave para mantener la organización funcional de la célula. Por ejemplo, las enzimas lisosómicas deben transportarse específicamente desde el aparato de Golgi a los lisosomas —no a la membrana plasmática o al RE—. Algunas de las señales que dirigen a las proteínas a los orgánulos específicos, como los lisosomas, ya se han tratado en este capítulo. Estas proteínas se transportan en vesículas, por lo que la especificidad del transporte se basa en el empaquetamiento selectivo de la carga seleccionada en vesículas que reconozcan y se fusionen sólo con la membrana diana apropiada. Dada la gran importancia que tiene el trans-

porte de las vesículas en la organización de la célula eucariota, el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el empaquetamiento de las vesículas, la gemación, y la fusión es un área principal de investigación en biología celular.

### *Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas*

Tres abordajes experimentales diferentes han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos del transporte de las vesículas: (1) el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosas en el transporte y distribución de las proteínas; (2) la reconstitución del transporte de vesículas en sistemas acelulares; y (3) el análisis bioquímico de las vesículas sinápticas, que son las responsables de la secreción regulada de los neurotransmisores por las neuronas. Cada uno de estos sistemas experimentales tiene diferentes ventajas para el conocimiento de aspectos concretos del proceso de transporte. Sin embargo, lo más importante, es el hecho de que los resultados derivados de estas tres líneas de investigación han convergido, indicando que la secreción está regulada por mecanismos moleculares similares en células tan distintas como las levaduras y las neuronas de los mamíferos.

Al igual que ocurre en otras áreas de la biología celular, las levaduras son útiles para estudiar la vía secretora porque son susceptibles de poderse realizar un análisis genético. Concretamente, Randy Schekman y sus colaboradores han sido pioneros en el aislamiento de mutantes de levaduras defectuosos en el transporte vesicular. Estos incluyen mutantes defectuosos en varios pasos de la secreción proteica (mutantes *sec*), mutantes incapaces de transportar proteínas a la vacuola, y mutantes incapaces de retener las proteínas residentes en el RE. El aislamiento de tales mutantes en las levaduras condujo a la clonación molecular y al análisis de los genes correspondientes, identificándose varias proteínas implicadas en diversos pasos de la vía secretora. Por ejemplo, ya se vio en este Capítulo el papel de Sec61 como un componente fundamental del canal de translocación de las proteínas en el retículo endoplásmico.

Los estudios bioquímicos sobre el transporte vesicular utilizando sistemas reconstituidos han complementado estos estudios genéticos y han permitido aislar directamente proteínas de transporte en las células de mamíferos. El primer sistema de transporte acelular lo desarrolló James Rothman y colaboradores, que analizaron el transporte de proteínas entre los compartimentos del aparato de Golgi (Fig. 9.31). El diseño experimental utilizó una línea celular mutante de mamífero, que carecía de la enzima requerida para transferir los residuos de *N*-acetilglucosamina al *N*-oligosacárido en una fase temprana de su modificación en el aparato de Golgi (véase Fig. 9.25). Por lo tanto, las glicoproteínas producidas por esta línea celular mutante carecían de las unidades de *N*-acetilglucosamina añadidas. Sin embargo, si el apilamiento del Golgi aislado de la línea celular mutante se incubaba con un apilamiento aislado de células normales, los residuos de *N*-acetilglucosamina se añadían a las glicoproteínas sintetizadas por las células mutantes. Diferentes experimentos establecieron que esto se debía al transporte vesicular de las proteínas desde el apilamiento del Golgi de la línea celular mutante al apilamiento del Golgi de las células normales, por lo que la adición de *N*-acetilglucosamina proporcionaba un marcador detectable sencillo del transporte de vesículas en este sistema reconstituido. Se han desarrollado otros sistemas reconstituidos similares para analizar el transporte entre otros compartimentos, incluyendo el transporte desde el RE al Golgi y el transporte desde el Golgi a las vesículas de secreción, a las vacuolas, y a la membrana plasmática. El desarrollo de estos sistemas *in vitro* ha permitido realizar estudios bioquímicos del proceso de transporte y el análisis funcional de las proteínas identificadas mediante mutaciones en levaduras, así como el aislamiento directo de algunas de las proteínas implicadas en la gemación y la fusión de las vesículas.

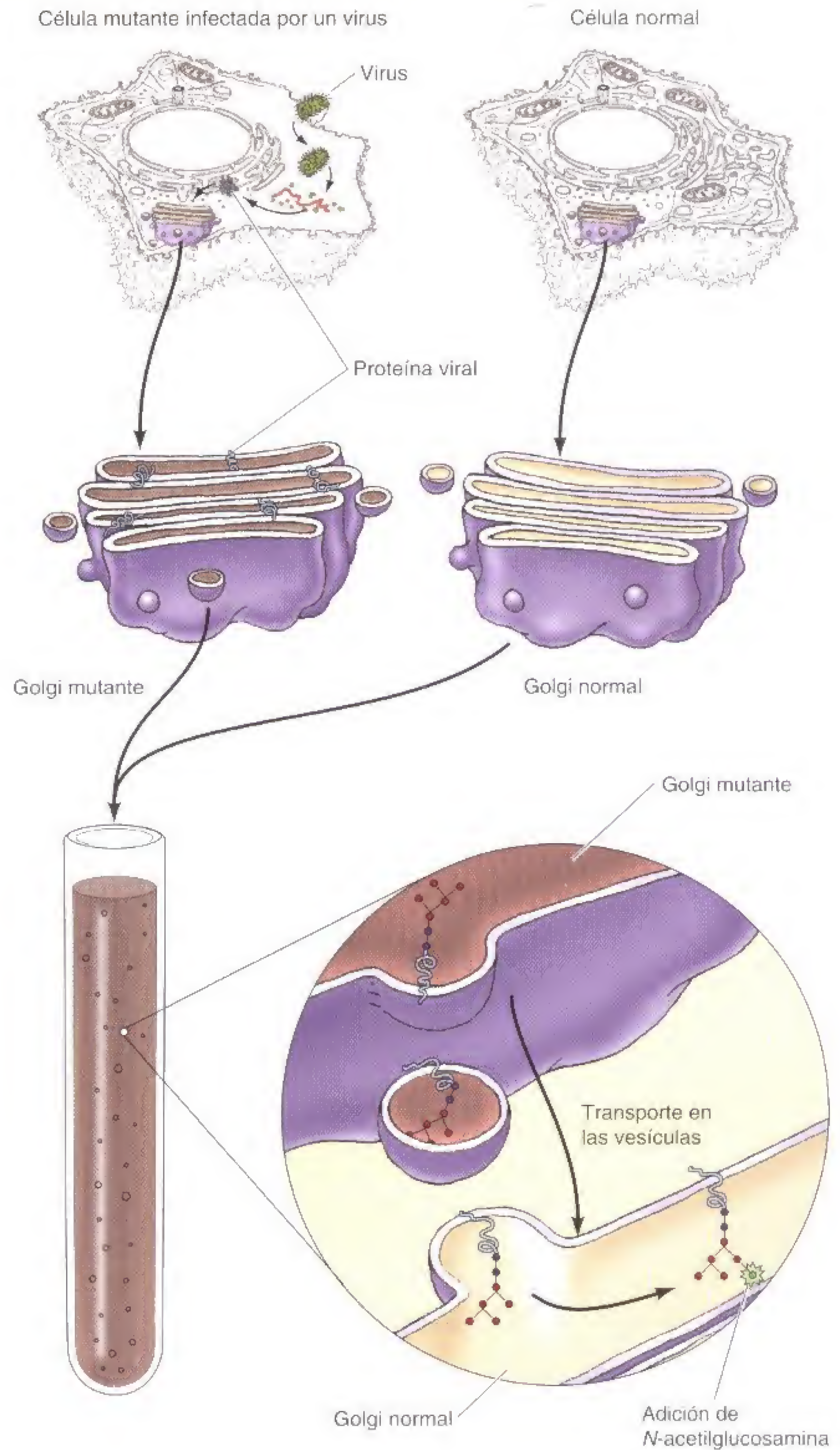



*Figura 9.31*
**Transporte vesicular reconstituido.** Los apilamientos del Golgi, preparados a partir de una línea celular mutante infectada por un virus, incapaces de catalizar la adición de *N*-acetilglucosamina a los *N*-oligosacáridos, se mezclan con apilamientos del Golgi de una línea celular normal. Puesto que la línea celular mutante ha sido infectada con un virus, las proteínas que sintetiza se pueden detectar específicamente. El transporte de estas proteínas a los apilamientos del Golgi normal es señalizado por la adición de *N*-acetilglucosamina.

Los estudios sobre la transmisión sináptica en las neuronas, que representa una forma altamente especializada de la secreción regulada, han revelado aspectos críticos de los mecanismos moleculares del transporte vesicular. Una sinapsis es la unión de una neurona con otra célula, que puede ser o bien otra neurona o un efector, como una célula muscular. La información se transmite a través de la sinapsis mediante neurotransmisores químicos, como la acetilcolina, que se almacenan en **vesículas sinápticas**. La estimulación de la neurona

transmisora desencadena la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que produce la liberación de los neurotransmisores y la estimulación de la neurona postsináptica o célula efectora. Las vesículas sinápticas son extremadamente abundantes en el cerebro, lo que permite que se puedan purificar en grandes cantidades para el análisis bioquímico. Algunas de las proteínas aisladas de las vesículas sinápticas están estrechamente relacionadas con las proteínas que, mediante análisis genético de levaduras y experimentos de reconstitución, se mostró que desempeñan un papel crítico en el transporte de las vesículas; por lo que el análisis bioquímico de estas proteínas ha revelado aspectos importantes del mecanismo molecular de la fusión de las vesículas.

### *Selección de la mercancía, proteínas de revestimiento y gemación de vesículas*

Son necesarios tres procesos en cada paso de la vía secretora, donde las proteínas transmembrana, las luminares y sus receptores son empaquetados en vesículas (Fig. 9.22). En primer lugar, las proteínas mercancía son separadas de las proteínas dirigidas a otros destinos y de las proteínas que deben permanecer atrás. En segundo lugar, una yema que contiene la mercancía debe desarrollarse en la membrana y separarse de ella para formar una vesícula de transporte. Tercero, esa vesícula de transporte debe moverse hacia la membrana diana y fusionarse con ella. La formación de la mayoría de las vesículas de transporte está regulada por proteínas de unión a GTP, a través de proteínas adaptadoras que interaccionan directamente con una proteína del revestimiento vesicular. Actualmente, se conocen tres familias de proteínas de unión a GTP implicadas en la gemación de vesículas: la familia de los factores de ADP-ribosilación, de la cual ARF1 es la más conocida; Sar1; y la gran familia de proteínas Rab. La unión secuencial y cooperativa de proteínas de unión a GTP y proteínas adaptadoras o efectoras establece una «plataforma» sobre la membrana, específica para un proceso determinado, como el ensamblaje y gemación de una vesícula de transporte dirigida desde la red del *trans* Golgi hacia los endosomas y lisosomas. Proteínas individuales del complejo pueden participar en el ensamblaje de vesículas de transporte dirigidas a otros puntos, o en la fusión de la vesícula (descrita más adelante en el capítulo), pero cada complejo proteico es, aparentemente, único para un proceso concreto de gemación, transporte o fusión.

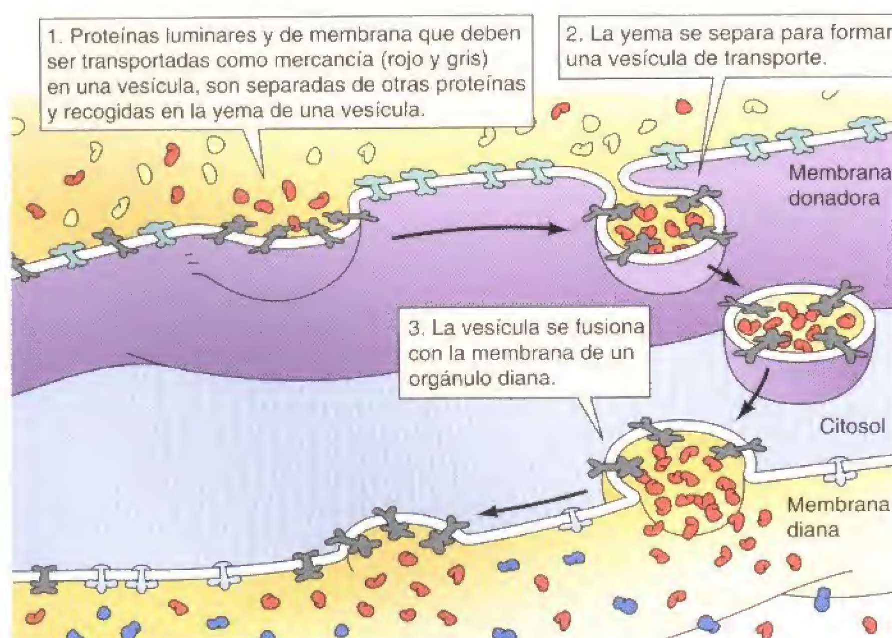



*Figura 9.32*
**Formación y fusión de una vesícula de transporte.**

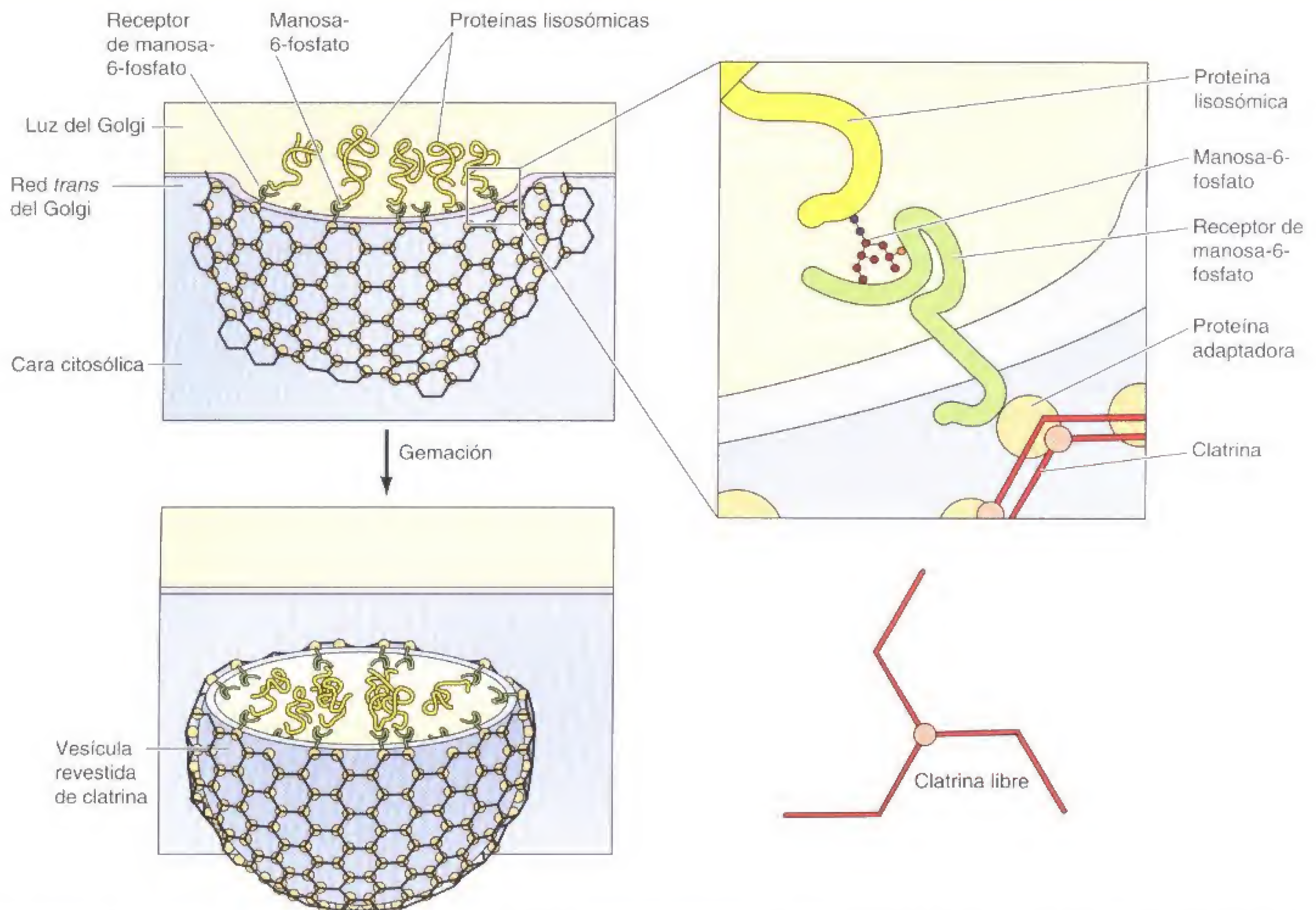



*Figura 9.33*
**Incorporación de proteínas lisosómicas a vesículas revestidas por clatrina.** Las proteínas dirigidas a los lisosomas están marcadas por manosa-6-fosfato, que se une a los receptores de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi. Los receptores de manosa-6-fosfato atraviesan la membrana del Golgi y actúan como sitios de unión para las proteínas adaptadoras citosólicas, que a su vez se unen a la clatrina. Las clatrinas están constituidas por tres cadenas proteicas que se asocian entre sí para formar una red semejante a la de las canastas de baloncesto, que distorsiona la membrana y dirige la gemación de las vesículas.

La mayoría de las vesículas de transporte están revestidas con proteínas citosólicas, denominadas así, vesículas revestidas. Se han caracterizado tres tipos de vesículas revestidas que parecen funcionar en distintos tipos de transporte vesicular. Las primeras que fueron descritas son las **vesículas revestidas de clatrina** (Fig. 9.33), que son responsables de la internalización de moléculas extracelulares de la membrana plasmática por endocitosis (ver Capítulo 12), además del transporte de moléculas desde la red del *trans* Golgi hacia los endosomas y lisosomas. Se han identificado otros dos tipos de vesículas que se forman a partir del RE y el complejo del Golgi. Estas vesículas se denominan no revestidas de clatrina o **vesículas revestidas de COP** (COP indica proteína del revestimiento, *coat protein*). Una clase de estas vesículas, vesículas revestidas de COPII, se forma a partir del RE y transporta su mercancía a lo largo de la vía secretora hasta el aparato de Golgi. Por el contrario, las vesículas revestidas de COPI se forman a partir del compartimento intermedio RE-Golgi, o del aparato de Golgi, y funcionan en los mecanismos de recuperación que retienen a las proteínas residentes del Golgi y el RE. Por ejemplo, las vesículas revestidas de COPI transportan proteínas residentes del RE, marcadas con las señales de recuperación KDEL o KKXX, de nuevo al RE, desde el compartimento intermedio RE-Golgi, o desde la red *cis* Golgi. La identidad de la proteína de revestimiento, si existe, de las vesículas que se mueven desde una cisterna del Golgi a otra durante la secreción sigue siendo desconocida.

La formación de las vesículas revestidas de clatrina en la red del *trans* Golgi requiere clatrina, dos tipos de proteínas adaptadoras y la proteína de unión a GTP, ARF1. El ensamblaje de este complejo es un proceso altamente regulado (Fig. 9.34). En primer lugar, ARF/GDP se une a proteínas de la membrana del Golgi. A continuación, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina de

ARF presente en la membrana estimula el intercambio de GDP por GTP. ARF/GTP inicia el proceso de gemación reclutando a las proteínas adaptadoras, que funcionarán como sitios de unión tanto para el receptor de manosa-6-fosfato, como para la clatrina. La **clatrina** juega un papel estructural ensamblándose en una estructura reticular en forma de cesto que distorsiona la membrana y dirige la formación de la vesícula.

En algún momento durante el transporte, el GTP unido a ARF1 es hidrolizado a GDP y el complejo ARF/GDP es liberado de la membrana para reciclarse. Esto debilita la unión cooperativa del complejo del revestimiento, permitiendo que moléculas de Hsp70 presentes en el citoplasma disocien la mayoría de las proteínas del revestimiento de la membrana vesicular. Algunas de las proteínas restantes permiten que las vesículas que viajan desde la red del *trans* Golgi hacia los endosomas y lisosomas se desplacen sobre microtúbulos hasta sus dianas, interaccionando con motores moleculares específicos basados en la tubulina, como se describe en el Capítulo 11.

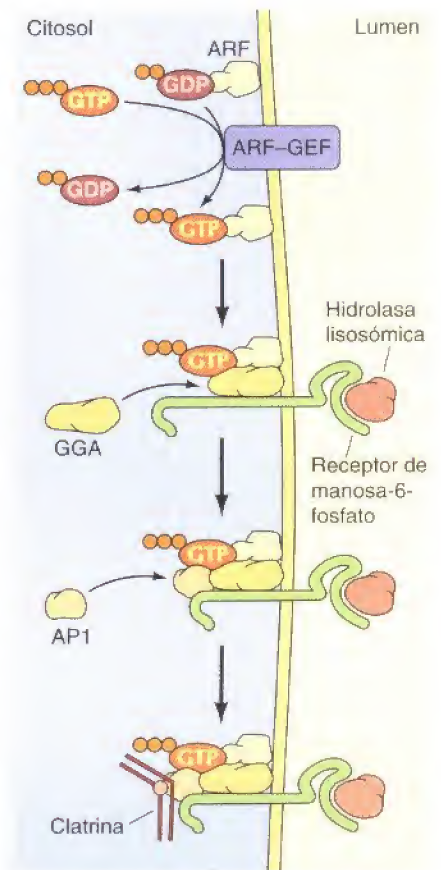



*Figura 9.34*
**Iniciación de una vesícula revestida de clatrina por ARF.** La proteína pequeña de unión a GTP, ARF, puede iniciar la formación de una vesícula revestida de clatrina en la membrana del *trans* Golgi. Una vez transportada a la membrana, ARF/GDP es activada en ARF/GTP por un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico para ARF. ARF/GTP recluta a la membrana a una proteína adaptadora GGA, y esta proteína recluta al receptor de manosa-6-fosfato, que transporta a la hidrolasa lisosómica, interaccionando con la cola citoplásmica del receptor. GGA también recluta a una segunda proteína adaptadora, AP1, que sirve como sitio de unión para el ensamblaje de una cubierta de clatrina sobre la vesícula.

### *Fusión de las vesículas*

La fusión de una vesícula de transporte con su diana implica dos tipos de acontecimientos. En primer lugar, la vesícula de transporte debe reconocer específicamente la membrana diana correcta; por ejemplo, una vesícula que transporta enzimas lisosómicas tiene que llevar su carga sólo a los lisosomas. En segundo lugar, la membrana de la vesícula y la membrana diana deben fusionarse, entregándose el contenido de la vesícula al orgánulo diana. Las investigaciones realizadas en los últimos años han conducido a un modelo de fusión vesicular en el que el reconocimiento específico entre una vesícula y su diana está mediado por la interacción específica entre pares de proteínas transmembrana, seguido de la fusión entre las bicapas fosfolipídicas de la vesícula y de la membrana diana.

Las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas se identificaron por primera vez en el laboratorio de James Rothman, mediante el análisis bioquímico de sistemas de transporte vesicular reconstituidos procedentes de células de mamíferos (véase Fig. 9.31). El análisis de las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas en estos sistemas condujo a Rothman y a sus colaboradores a proponer un modelo general, denominado la **hipótesis SNARE**, en el que la fusión de las vesículas está mediada por la interacción entre un par específico de proteínas, denominadas SNAREs, en la membrana de la vesícula y en la membrana diana (v-SNAREs y t-SNAREs, respectivamente). De acuerdo con esta hipótesis, la formación de complejos entre v-SNAREs en la vesícula y t-SNAREs sobre las membranas diana dan lugar a la fusión de las membranas. Esta hipótesis estaba apoyada por la identificación de SNAREs que estaban presentes en las vesículas sinápticas y por el descubrimiento de mutantes de la secreción en levaduras que parecían codificar las SNAREs necesarias para una variedad de eventos del transporte vesicular. Por ejemplo, el transporte desde el RE hasta el Golgi en levaduras requiere SNAREs específicas que están localizadas tanto en la membrana vesicular como en la membrana diana.

Investigaciones recientes han confirmado que las SNAREs son necesarias para la fusión de una vesícula con una membrana diana y que el apareamiento SNARE-SNARE proporciona la energía necesaria para acercar ambas bicapas lo suficiente como para desestabilizarlas y resultar en su fusión. Sin embargo, la llegada, unión y fusión de las vesículas de transporte a membranas diana específicas parece estar mediado por un complejo proteico ensamblado secuencialmente, muy parecido al que dio lugar a la gemación de la vesícula de transporte. Miembros de la familia **Rab** de proteínas pertenecientes a las proteínas pequeñas de unión a GTP, juegan papeles clave en la llegada de las vesículas de transporte. Las proteínas Rab, al igual que la familia ARF, participan en muchas de las reacciones de gemación y fusión de vesículas durante el transporte vesicular. Más de 60 proteínas Rab diferentes han sido identificadas e implicadas en procesos específicos del transporte vesicular (Tabla 9.1). Funcionan en mu-

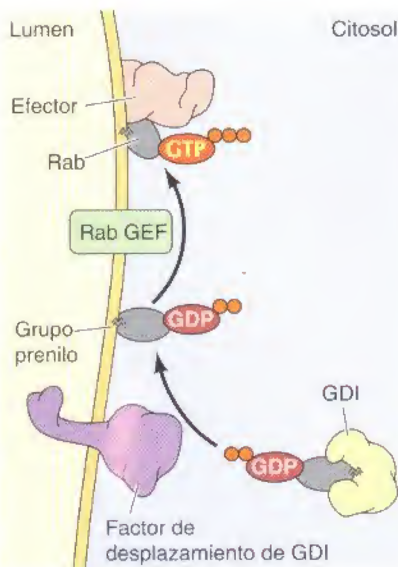



*Figura 9.35*
**Transporte de Rab a una membrana.** La proteína pequeña de unión a GTP Rab se modifica por la adición de un grupo prenilo, que le permite insertarse en una membrana (ver Figura 7.32). Rab es transportada en el citosol unida a un inhibidor de disociación de GDP (GDI), que la mantiene en el estado Rab/GDP. En la membrana, un factor de desplazamiento de GDI inespecífico puede separar el Rab/GDP del GDI e insertarlo en la membrana. Si se encuentra presente un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico para Rab, el GDP unido a Rab será intercambiado por GTP, y la forma activa Rab/GTP puede interaccionar con proteínas efectoras. Si el factor de intercambio de nucleótidos de guanina apropiado no está presente, el Rab/GDP será retirado por una GDI y transportado a otra membrana.

chos pasos del tráfico vesicular, incluyendo la interacción con las SNAREs para regular y facilitar la formación de los complejos SNARE/SNARE.

Las proteínas Rab individuales o combinaciones de proteínas Rab caracterizan a distintos orgánulos y vesículas de transporte, así que su localización en la membrana correcta es clave para establecer la especificidad del transporte vesicular (Fig. 9.35). Las proteínas Rab son transportadas a través del citosol en su forma unida a GDP por inhibidores de la disociación de GDP (GDIs). En la membrana, son retirados de los GDIs por factores de desplazamiento de GDI. Entonces, factores de intercambio de nucleótidos específicos convierten el Rab/GDP en la forma activa Rab/GTP. Factores de intercambio de nucleótidos de guanina individuales se localizan en membranas específicas y actúan sobre miembros específicos de la familia Rab, de modo que son responsables de la formación de los complejos Rab/GTP activos en los puntos correctos de la membrana. En ausencia del factor de intercambio apropiado, las proteínas Rab permanecen como Rab/GDP y son retiradas de la membrana.

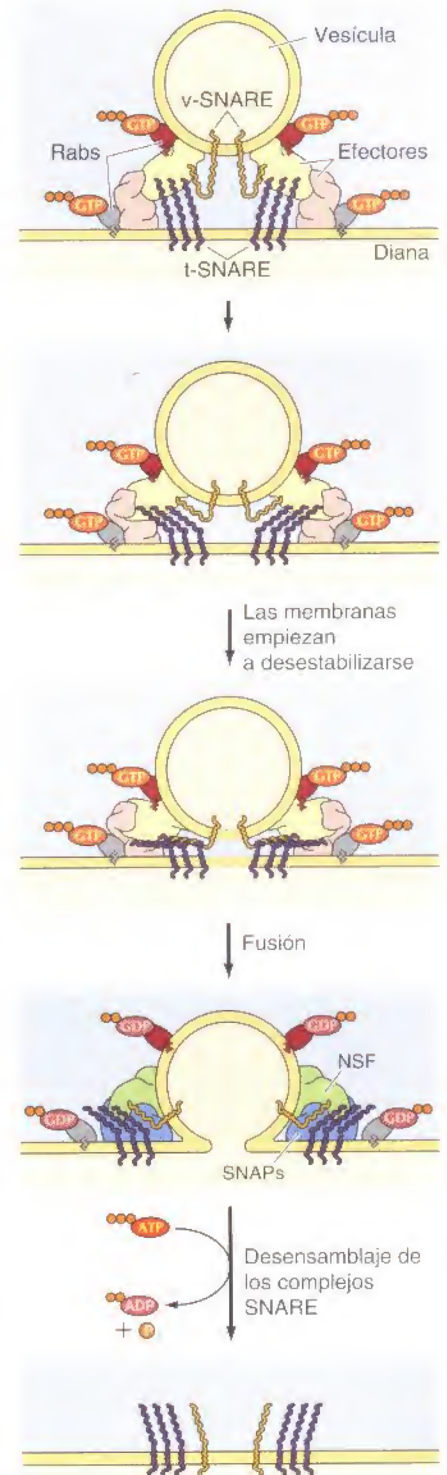
Para iniciar la fusión de las vesículas de transporte, el Rab/GTP de la vesícula de transporte recluta proteínas efectoras y v-SNAREs para ensamblar un complejo de pre-fusión (Fig. 9.36). Una proteína Rab distinta en la membrana diana organiza, de forma similar, otras proteínas efectoras y t-SNAREs. Cuando la vesícula de transporte se encuentra con su membrana diana, las proteínas efectoras unen las membranas mediante interacciones proteína-proteína. Este anclaje de la vesícula a la membrana diana permite a las v-SNAREs entrar en contacto con las t-SNAREs. Todas las proteínas SNARE poseen un largo dominio central de hélice enrollada como la que se encuentra en las láminas nucleares (ver Fig. 8.31). Al igual que en las láminas, este dominio se une fuertemente

**TABLA 9.1.** Proteínas de unión a Rab GTP y sus dianas de acción

| Paso del transporte | Proteínas Rab implicadas |
|---|---|
| **Exocitosis** | |
| RE transicional al Golgi | Rab1, Rab1b, Rab2 |
| Golgi al RE | Rab6, Rab6b |
| Intra-Golgi | Rab1, Rab6, Rab6b |
| Red del *trans* Golgi a la membrana plasmática | Rab11a, Rab11b |
| **Endocitosis** | |
| Membrana plasmática a endosoma temprano | Rab5a, Rab5b, Rab5c |
| Endosoma temprano a membrana plasmática | Rab4, Rab15, Rab18 |
| Endosoma temprano a endosoma tardío | Rab7 |
| **Papeles especiales** | |
| Exocitosis desde gránulos secretores | Rab8b |
| Endosoma tardío a la red del *trans* Golgi | Rab9, Rab11a, Rab11b |
| Red del *trans* Golgi a la membrana basolateral | Rab8a |
| Red del *trans* Golgi a la membrana apical | Rab21 |

Ejemplos de las 60 proteínas Rab cuyas localizaciones y presuntas funciones son conocidas.

*Figura 9.36*
**Fusión de vesículas.** La fusión vesicular es iniciada por Rab/GTP. Proteínas Rab específicas presentes en la membrana vesicular y en la membrana diana unen proteínas efectoras para anclar la vesícula a la membrana diana. Este anclaje permite que interaccionen las v-SNAREs y las t-SNAREs. Los dominios de hélice enrollada de las SNAREs interaccionan entre sí, proporcionando la energía necesaria para aproximar las membranas. Esta proximidad de las membranas desestabiliza las bicapas lipídicas y la vesícula y la membrana diana se fusionan. Cambios en las interacciones proteína-proteína reclutan a NSF y las SNAPs al complejo SNARE, y desensamblan el complejo empleando energía obtenida de la hidrólisis de ATP.




a otros dominios de hélice enrollada y, en efecto, une a las SNAREs, aproximando las dos membranas hasta un contacto casi directo. Esto genera una inestabilidad de las bicapas lipídicas y se fusionan. Siguiendo a la fusión de membranas, el complejo NSF/SNAP disocia el complejo SNARE, permitiendo así que las SNAREs sean reutilizadas en los siguientes ciclos de transporte vesicular. Puesto que la energía de la interacción SNARE-SNARE dirigió la fusión de las membranas, es necesaria la energía de la hidrólisis de ATP para separar las SNAREs.

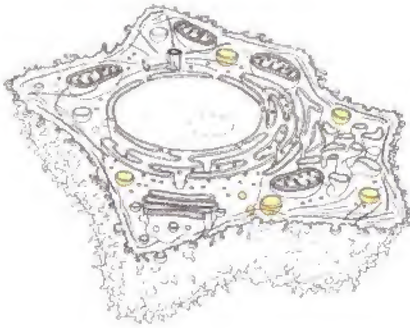
## Lisosomas

Los **lisosomas** son orgánulos rodeados de membrana que contienen una serie de enzimas capaces de degradar todas las clases de polímeros biológicos —proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos—. Los lisosomas funcionan como el sistema digestivo de la célula, sirviendo tanto para degradar el material captado del exterior de la célula como para digerir los componentes obsoletos de la propia célula. En su forma más sencilla, los lisosomas se observan como vacuolas esféricas densas, pero pueden exhibir diversidad de tamaños y de formas en función de los distintos materiales que hayan captado (Fig. 9.37). Por lo tanto los lisosomas representan orgánulos morfológicamente diversos definidos por la función común de degradar material intracelular.

### *Hidrolasas lisosómicas ácidas*

Los lisosomas contienen alrededor de 50 enzimas degradativas diferentes que pueden hidrolizar proteínas, ADN, ARN, polisacáridos y lípidos. Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas son responsables de más de 30 enfermedades congénitas humanas diferentes, que se denominan **enfermedades de depósito lisosómico**, ya que el material no degradado se acumula en los lisosomas de los individuos afectados. La mayoría de estas enfermedades se deben a deficiencias en una única enzima lisosómica. Por ejemplo, la enfermedad de Gaucher (la alteración más común) se debe a una mutación en el gen que codifica una enzima lisosómica requerida para la degradación de los glicolípidos. Una excepción curiosa es la enfermedad celular-I, que se debe a una eficiencia en la enzima que cataliza el primer paso en el marcaje de las enzimas lisosómicas con manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi (véase Fig. 9.26). El resultado es una alteración generalizada en la incorporación de las enzimas lisosómicas a los lisosomas.

Todas las enzimas lisosómicas son hidrolasas ácidas, que son activas al pH ácido (aproximadamente 5) del interior de los lisosomas pero no al pH neutro (aproximadamente 7,2) característico del resto del citoplasma (Fig. 9.38). El que estas hidrolasas lisosómicas necesiten un pH ácido proporciona una doble protección contra la digestión incontrolada de los contenidos del citosol; incluso si se rompiera la membrana lisosómica, las hidrolasas ácidas liberadas serían inactivas al pH neutro del citosol. Para mantener su pH ácido interno, los lisosomas deben concentrar activamente iones $H^+$ (protones). Esto se consigue mediante una bomba de protones en la membrana lisosómica, que transporta acti-



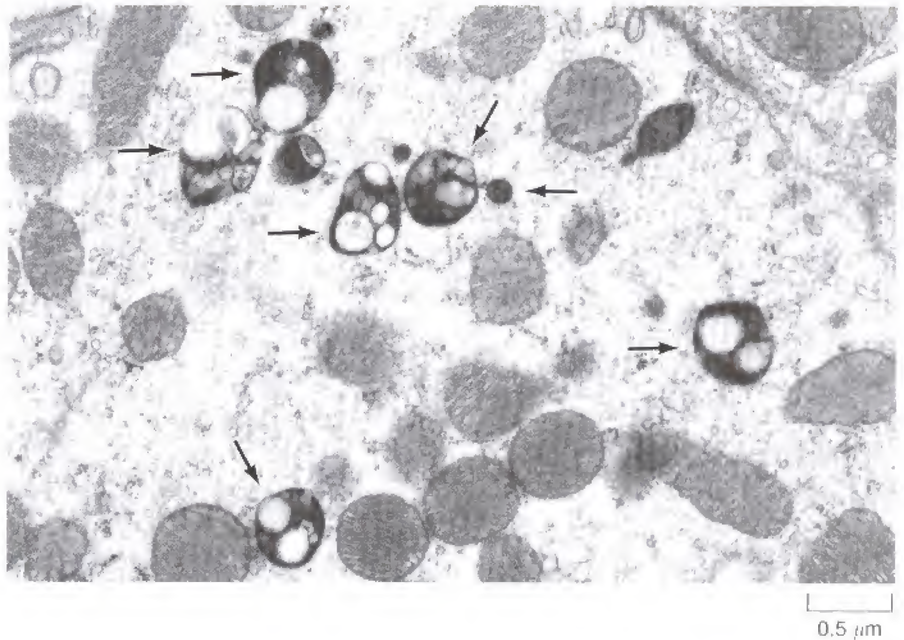



*Figura 9.37*
**Microfotografía electrónica de lisosomas y de mitocondrias en una célula de mamífero.** Los lisosomas están indicados con flechas.

vamente protones al lisosoma desde el citosol. Este bombeo requiere un gasto de energía en forma de hidrólisis de ATP, ya que mantiene una concentración de $H^+$ aproximadamente cien veces más elevada en el interior del lisosoma.

## *Endocitosis y formación del lisosoma*

Una de las funciones principales de los lisosomas es la digestión del material captado del exterior de la célula mediante **endocitosis**, que se discute en detalle en el Capítulo 12. Sin embargo, el papel de los lisosomas en la digestión del material captado mediante endocitosis se relaciona no sólo con la función de los lisosomas sino también con su formación. Concretamente, los lisosomas se forman mediante la fusión de las vesículas de transporte originadas desde la red *trans* del Golgi con los endosomas, que contienen las moléculas ingeridas por endocitosis a partir de la membrana plasmática.

La formación de los **endosomas** y de los lisosomas representa así una intersección entre la vía secretora, mediante la que se procesan las proteínas lisosómicas, y la vía endocítica, mediante la cual son ingeridas las moléculas extracelulares a partir de la superficie de la célula (Fig. 9.36). El material del exterior de la célula es ingerido en vesículas endocíticas revestidas de clatrina, que se originan por gemación de la membrana plasmática y seguidamente se funden con los endosomas primarios. A continuación los componentes de la membrana son reciclados a la membrana plasmática (se tratará con detalle en el Cap. 12) y los endosomas primarios van madurando a endosomas tardíos, que son los precursores de los lisosomas. Uno de los cambios importantes durante la maduración del endosoma es el descenso del pH interno hasta aproximadamente 5,5, lo que desempeña un papel clave en la liberación de las hidrolasas ácidas lisosómicas desde la red *trans* del Golgi.

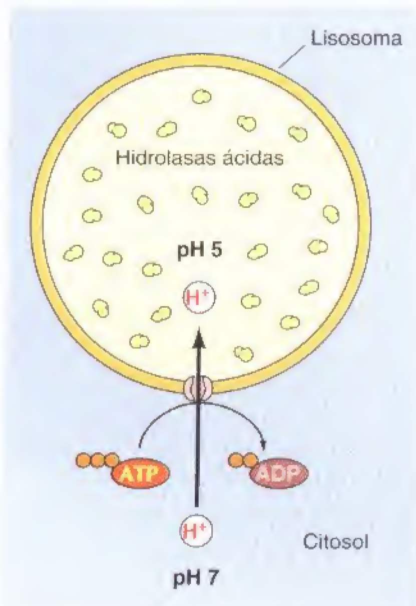



*Figura 9.38*
**Organización del lisosoma.** Los lisosomas contienen diversas hidrolasas ácidas que son activas al pH ácido interno del lisosoma, pero no al pH neutro del citosol. El pH interno ácido de los lisosomas es el resultado de la acción de una bomba de protones en la membrana del lisosoma, que importa protones desde el citosol acoplado a la hidrólisis de ATP.

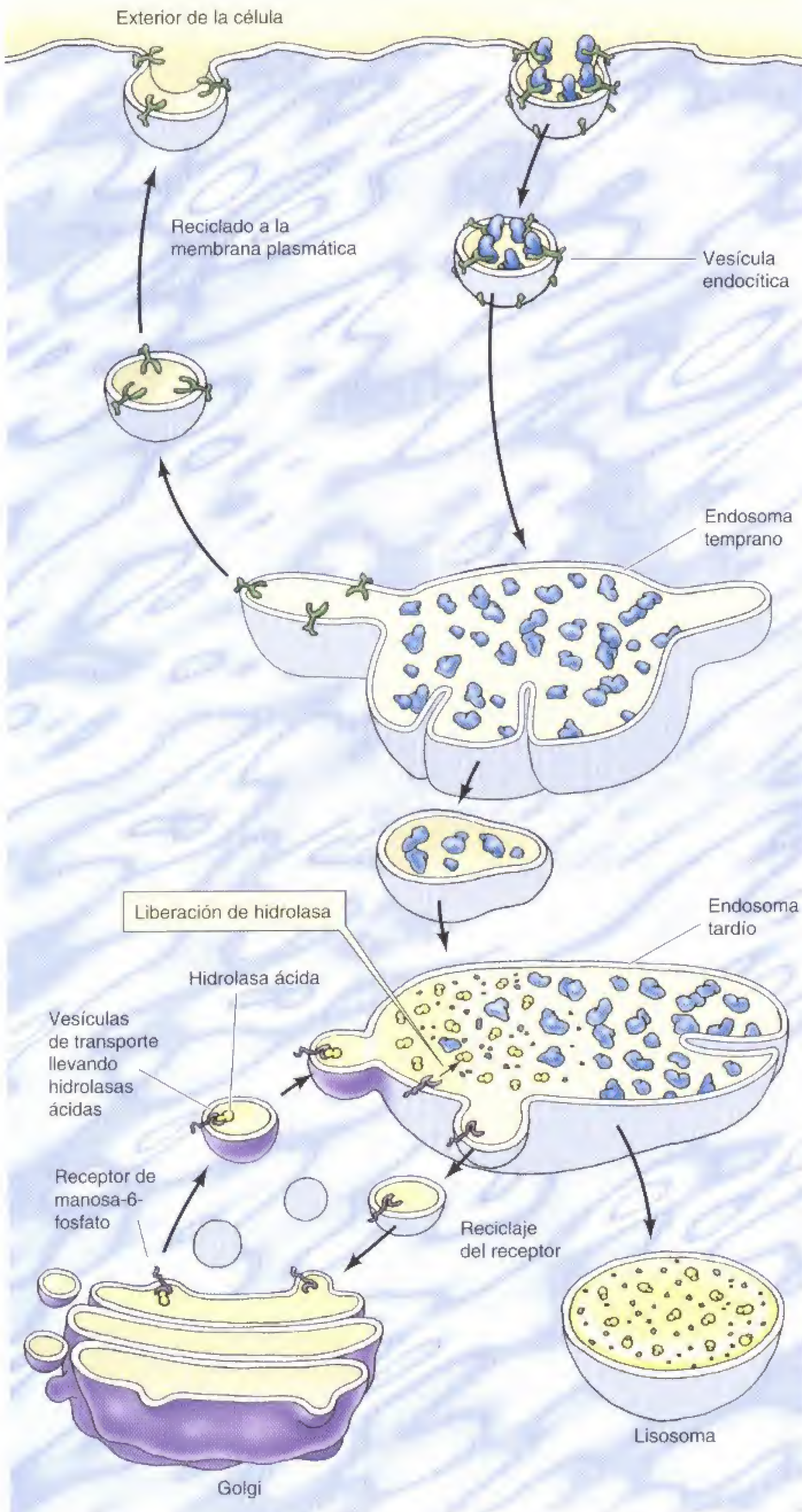



*Figura 9.39*

**Endocitosis y formación de los lisosomas.** Las moléculas son captadas del exterior de la célula mediante vesículas endocíticas, que se funden con los endosomas tempranos. Los componentes de la membrana son reciclados cuando los endosomas primarios maduran a endosomas tardíos. Las vesículas de transporte que llevan las hidrolasas ácidas desde el aparato de Golgi se fusionan posteriormente con los endosomas tardíos, que maduran a lisosomas cuando adquieren una carga completa de enzimas lisosómicas. Las hidrolasas ácidas se disocian del receptor de manosa 6-fosfato cuando las vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos, y los receptores son reciclados al aparato de Golgi.

Medicina molecular

# Enfermedad de Gaucher

## La enfermedad

La enfermedad de Gaucher es, de las enfermedades de depósito lisosómico, la más común, las cuales se deben a la incapacidad de los lisosomas para degradar sustancias que deberían degradar. La acumulación resultante de los compuestos no degradados da lugar a un aumento en el tamaño y número de los lisosomas en la célula, lo que acaba produciendo la disfunción celular y consecuencias patológicas en los órganos afectados. La enfermedad de Gaucher afecta principalmente a la población judía, con una frecuencia de aproximadamente 1 por cada 2.500 individuos. La enfermedad tiene tres variantes, que difieren en su severidad y en cómo afectan al sistema nervioso. La forma más común de la enfermedad (tipo I), no afecta al sistema nervioso; la enfermedad se manifiesta con esplenomegalia y hepatomegalia y por el desarrollo de lesiones óseas. Muchos pacientes con esta forma de la enfermedad no tienen síntomas importantes, y su esperanza de vida no se ve afectada. Las formas más severas de la enfermedad (tipos II y III) son mucho menos frecuentes y se presentan tanto en poblaciones judías como no judías. La forma más devastadora es la enfermedad tipo II, en la que la afectación neurológica es evidente en la infancia y los pacientes mueren a una edad temprana. La enfermedad tipo III, de severidad intermedia entre los tipos I y II, se caracteriza por la aparición de síntomas neurológicos (incluyendo demencia y espasticidad) alrededor de los diez años de edad.

## Bases moleculares y celulares

La causa de la enfermedad de Gaucher es la deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa, que cataliza la hidrólisis de los glucocerebrósidos a glucosa y ceramida (véase la Figura). Este déficit enzimático se demostró en 1965, y el gen responsable fue clonado en 1985. Desde entonces, se han identificado más de 30 mutaciones diferentes responsables de la enfermedad de Gaucher. Es interesante señalar que puede predecirse, en gran medida, la severidad de la enfermedad según la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, los pacientes con una mutación que conduce a la sustitución, relativamente conservada, del aminoácido serina por asparragina tienen la enfermedad tipo I; los pacientes con una mutación que da lugar a la sustitución de prolina por leucina tienen deficiencias enzimáticas más severas y desarrollan la enfermedad tipo II o III.

Excepto en las formas muy raras de la enfermedad, tipo II y III, las únicas células afectadas en la enfermedad de Gaucher son los macrófagos. Debido a que su función es eliminar las células envejecidas y dañadas mediante fagocitosis, los macrófagos continuamente ingieren gran cantidad de lípidos, que normalmente son degradados en los lisosomas. Por lo tanto, las deficiencias de glucocerebrosidasa resultan particularmente evidentes en los macrófagos de estos órganos, lo que concuerda con que las manifestaciones primarias en la mayoría de los casos de enfermedad de Gaucher sean alteraciones esplénicas y hepáticas.

## Prevención y tratamiento

La enfermedad de Gaucher es uno de los ejemplos más importantes de una enfermedad que puede tratarse mediante tratamiento enzimático sustitutivo, en el que se utiliza la administración exógena de una enzima para corregir un defecto enzimático. Este abordaje del tratamiento de las enfermedades de depósito lisosómico lo sugirió Christian deDuve en los años 60, y se basa en la idea de que las enzimas administradas exógenamente podrían ser ingeridas por endocitosis y transportarse a los lisosomas. Este abordaje es especialmente interesante en la enfermedad de Gaucher tipo I, ya que el macrófago es la única célula diana. En los años 70, se descubrió que los macrófagos expresan receptores en la superficie celular que se unen a residuos de manosa de glicoproteínas extracelulares e internalizan posteriormente estas proteínas por endocitosis. Este hallazgo hizo pensar que la glucocerebrosidasa administrada exógenamente podría ser dirigida específicamente a los macrófagos mediante modificaciones que expusieran residuos de manosa. Se modificó de la manera pertinente la enzima preparada a partir de placenta humana, y los estudios clínicos han demostrado claramente su efectividad en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

Desafortunadamente, el tratamiento sustitutivo enzimático para la enfermedad de Gaucher es caro: el coste sólo de la enzima para el tratamiento de un paciente a las dosis recomendadas está entre 50.000 y 500.000$ al año. El coste de este tratamiento lo sitúa muy por encima de los recursos de los pacientes, y ha generado la controversia social respecto al coste de los fármacos caros para el tratamiento de las enfermedades poco frecuentes.

## Referencias

Beutler, E. 1996. The cost of treating Gaucher's disease. *Nature Med.* 2: 523-524.

Zhao, H. and G. A. Grabowski. 2002. Gaucher diesease: perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 694-707

O
$CH_2$
HC—NH
HCOH C=O
Glucocerebrosidasa

Glucocerebrosidasa

Glucosa

+

OH
$CH_2$
HC—NH
HCOH C=O
Ceramida

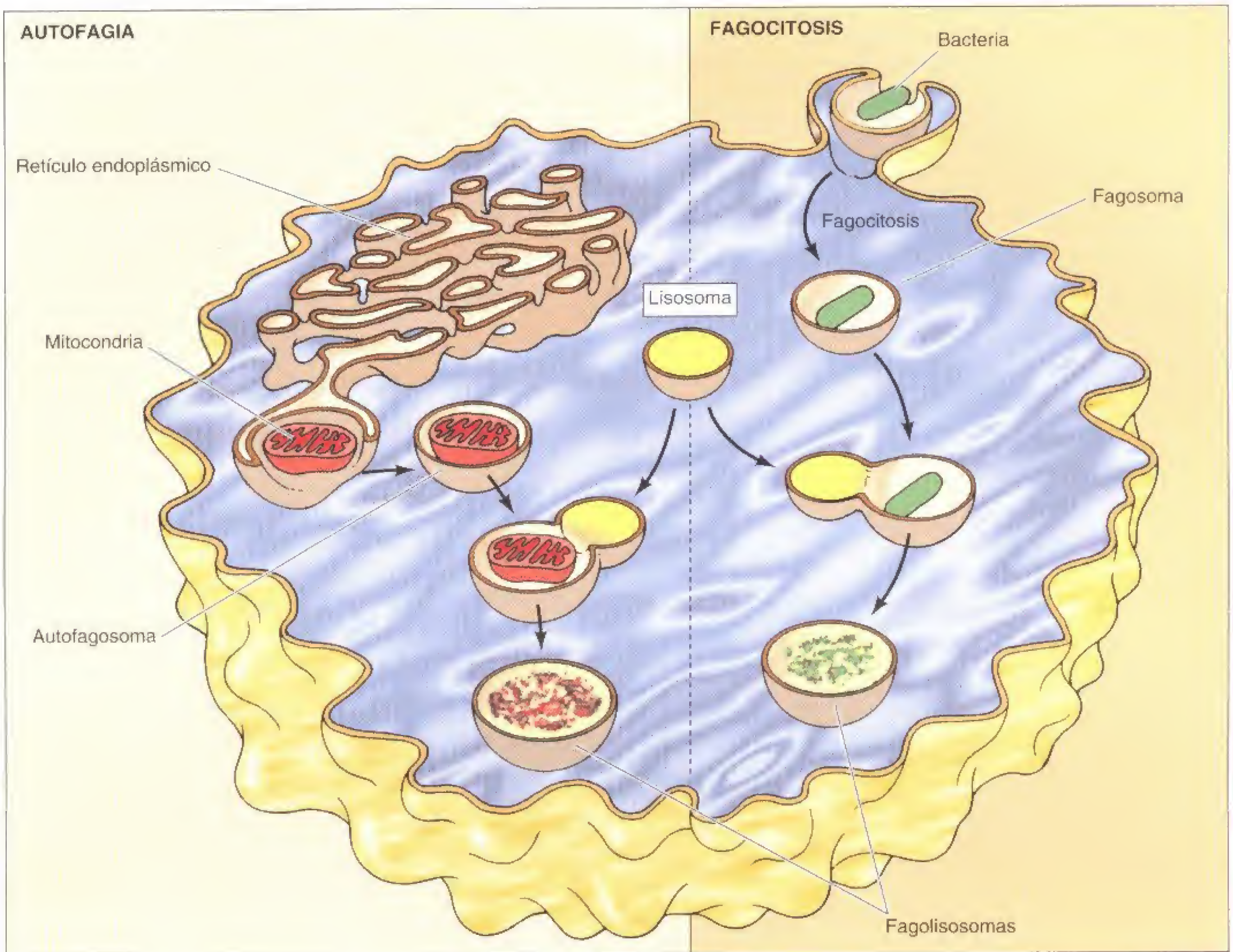



*Figura 9.40*
**Los lisosomas en la fagocitosis y en la autofagia.** En la fagocitosis, partículas grandes (como bacterias) son ingeridas en vacuolas fagocíticas o fagosomas. En la autofagia, los orgánulos internos (como las mitocondrias) son englobados por fragmentos de membrana procedentes del RE, formando los autofagosomas. Tanto los fagosomas como los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas grandes, en los que son digeridos sus contenidos.

Como se trató previamente, las hidrolasas ácidas son dirigidas a los lisosomas por residuos de manosa-6-fosfato, que son reconocidos por los receptores de manosa-6-fosfato en la red *trans* del Golgi y empaquetados en vesículas revestidas de clatrina. Tras la liberación de la cubierta de clatrina, estas vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos, y el pH interno ácido hace que las hidrolasas se disocien del receptor de manosa-6-fosfato (véase Fig. 9.39). Las hidrolasas son así liberadas en la luz del endosoma, mientras que los receptores permanecen en la membrana y finalmente son reciclados al Golgi. Los endosomas tardíos maduran entonces a lisosomas a medida que adquieren una carga completa de hidrolasas ácidas, que digieren las moléculas originalmente ingeridas por endocitosis.

## *Fagocitosis y autofagia*

Además de degradar las moléculas englobadas por endocitosis, los lisosomas digieren el material derivado de otras dos rutas: la fagocitosis y la autofagia (Fig. 9.37). En la **fagocitosis**, células especializadas, como los macrófagos, ingieren y degradan partículas grandes, incluyendo bacterias, restos de células, y células envejecidas que han de ser eliminadas del organismo. Estas partícu-

las grandes son ingeridas en vacuolas fagocíticas (**fagosomas**), que posteriormente se fusionan con los lisosomas, dando lugar a la digestión de su contenido. Los lisosomas formados de esta manera (**fagolisosomas**) pueden ser bastante grandes y heterogéneos, ya que su tamaño y forma viene determinado por el contenido del material que esté siendo digerido.

Los lisosomas también son responsables de la **autofagia**, la renovación gradual de los propios componentes de la célula. El primer paso de la autofagia parece ser el que un orgánulo (p. ej., una mitocondria) sea englobado por una membrana derivada del RE. La vesícula resultante (**un autofagosoma**) se fusiona después con un lisosoma, y su contenido es digerido (véase Fig. 9.40).

| PALABRAS CLAVE | RESUMEN |
|---|---|
| | **RETÍCULO ENDOPLÁSMICO** |
| **retículo endoplásmico (RE), RE rugoso, RE de transición, RE liso, vesícula secretora, vía secretora.** | ***Retículo endoplásmico y secreción de proteínas:*** El retículo endoplásmico es el primer cruce de caminos en la distribución de las proteínas. En las células de los mamíferos, las proteínas destinadas a la secreción, a los lisosomas o a la membrana plasmática se traducen en los ribosomas unidos a membrana y son transferidas al RE rugoso mientras están siendo traducidas. |
| **secuencia señal, microsoma, partícula de reconocimiento de la señal (SRP), ARNsrp, receptor de SRR, translocón, peptidasa de la señal** | ***Marcaje de las proteínas para dirigirse al retículo endoplásmico:*** Las proteínas pueden dirigirse al RE bien mientras están siendo traducidas o tras haber finalizado su traducción en el citosol. En las células de mamíferos, la mayoría de las proteínas son translocadas al RE mientras están siendo traducidas en ribosomas unidos a membrana. Los ribosomas que intervienen en la síntesis de las proteínas secretadas son dirigidos al retículo endoplásmico mediante secuencias señal en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. Las cadenas polipeptídicas en crecimiento son translocadas posteriormente al RE a través de canales proteicos, y se liberan en la luz del RE al ser escindida la secuencia señal. |
| | ***Inserción de proteínas en la membrana del RE:*** Las proteínas integrales de membrana de la membrana plasmática o de las membranas del RE, del aparato de Golgi y de los lisosomas, se insertan inicialmente en la membrana del RE. En lugar de ser translocadas a la luz del RE, estas proteínas se anclan por hélices alfa que atraviesan la membrana y que detienen la transferencia de la cadena polipeptídica en crecimiento a través de la membrana. |
| **proteína disulfuro isomerasa, anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), calnexina, calreticulina** | ***Plegamiento y procesamiento de proteínas en el RE:*** Las cadenas polipeptídicas se pliegan en su conformación tridimensional correcta en el RE. En el RE también tiene lugar la *N*-glicosilación y la adición de los anclajes GPI. Aquellas proteínas que no pueden plegarse correctamente son separadas de la vía secretora y marcadas para la degradación. |
| **flipasa** | ***RE liso y síntesis de lípidos:*** El RE es el sitio principal de síntesis de lípidos en las células eucariotas, y el RE liso abunda en las células que tienen un metabolismo lipídico activo y que realizan la destoxificación de fármacos liposolubles. |
| | ***Exportación de proteínas y lípidos desde el RE:*** Las proteínas y los lípidos son transportados en vesículas desde el RE al aparato de Golgi. Las proteínas residentes en el RE están marcadas por secuencias que señalizan su regreso desde el Golgi al RE mediante una vía de reciclaje. Otras secuencias señalizadoras median el empaquetamiento selectivo de las proteínas que van a ser exportadas, en vesículas que las transportan al Golgi. |

## APARATO DE GOLGI

***Organización del Golgi:*** El aparato de Golgi participa en el procesamiento y en la distribución de las proteínas, así como en la síntesis de lípidos y polisacáridos. Las proteínas son transportadas desde el retículo endoplásmico a la red *cis* del Golgi. Desde ahí se transportan al apilamiento del Golgi, que representa el lugar metabólicamente más activo del aparato de Golgi. Las proteínas modificadas son transportadas desde el apilamiento del Golgi a la red *trans* del Golgi, donde se distribuyen y se empaquetan en vesículas que se transportarán a los lisosomas, a la membrana plasmática, o al exterior celular.

**aparato de Golgi, complejo de Golgi, red *cis* del Golgi, apilamiento del Golgi, red *trans* del Golgi**

***Glicosilación de proteínas en el Golgi:*** Los *N*-oligosacáridos añadidos a las proteínas en el RE son modificados en el Golgi. Aquellas proteínas destinadas a los lisosomas son fosforiladas específicamente en los residuos de manosa, y la manosa-6-fosfato actúa como una señal que dirige su transporte a los lisosomas desde la red *trans* del Golgi. En el Golgi también tiene lugar la *O*-glicosilación.

**manosa-6-fosfato, región señal**

***Metabolismo de lípidos y de polisacáridos en el Golgi:*** El aparato de Golgi es el lugar donde se sintetizan los glicolípidos, la esfingomielina y los polisacáridos complejos de la pared celular vegetal.

***Distribución y exportación de proteínas desde el aparato de Golgi:*** Las proteínas se distribuyen en la red *trans* del Golgi para ser empaquetadas en vesículas de transporte que se dirigen a ser secretadas, a la membrana plasmática, a los lisosomas o a las vacuolas de las levaduras y plantas. En las células polarizadas, las proteínas se dirigen específicamente a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

**dominio apical, dominio basolateral, vacuola**

## MECANISMO DE TRANSPORTE DE LAS VESÍCULAS

***Aproximaciones experimentales al conocimiento del transporte de las vesículas:*** El mecanismo de transporte de las vesículas se ha determinado mediante el estudio de mutantes de levaduras, de sistemas reconstituidos de células libres y de vesículas sinápticas.

**vesícula sináptica**

***Selección de la mercancía, proteínas de revestimiento y gemación de vesículas:*** La superficie citoplásmica de las vesículas está recubierta de proteínas que dirigen la gemación de las vesículas y que seleccionan las moléculas específicas a que serán transportadas.

**vesícula revestida de clatrina, vesícula revestida COP**

***Fusión de las vesículas:*** La unión de las vesículas con la membrana diana adecuada está mediada por interacciones entre pares de proteínas transmembrana, lo que da lugar a la fusión de las membranas.

**hipótesis SNARE, Rab**

## LISOSOMAS

***Hidrolasas ácidas lisosómicas:*** Los lisosomas contienen una serie de hidrolasas ácidas que degradan proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Estas enzimas funcionan específicamente al pH ácido del interior de los lisosomas.

**lisosoma, enfermedad de depósito lisosómico**

***Endocitosis y formación de los lisosomas:*** Las moléculas extracelulares captadas por endocitosis son transportadas a los endosomas, que maduran a lisosomas a medida que se traen hidrolasas ácidas desde el Golgi.

**endocitosis, endosoma**

***Fagocitosis y autofagia:*** Los lisosomas son responsables de la degradación de partículas grandes, ingeridas mediante la fagocitosis, y de la digestión gradual de los propios componentes de la célula mediante la autofagia.

**fagocitosis, fagosoma, fagolisosoma, autofagia, autofagosoma**

## Preguntas

**1.** ¿Cuál era la evidencia experimental original que indicaba la vía secretora RE rugoso → aparato de Golgi → vesículas secretoras → proteína secretada?

**2.** ¿Cómo proporcionó la traducción *in vitro* de ARNm pruebas de la existencia de una secuencia señal que dirige a proteínas secretoras potenciales al retículo endoplásmico rugoso?

**3.** Diferencias entre la translocación cotraduccional y postraduccional de cadenas polipeptídicas al retículo endoplásmico, incluyendo la fuerza motriz de ambas.

**4.** Sec61 es un componente crítico del canal proteico localizado en la membrana del RE. En las células mutantes para Sec61, ¿cuál es el destino de las proteínas que normalmente se localizan en el aparato de Golgi?

**5.** ¿Por qué los grupos de carbohidratos de las glicoproteínas están siempre expuestos en la superficie de la célula?

**6.** ¿Cuál sería el efecto de una mutación o una deleción de la secuencia KDEL de una proteína residente en el RE como BiP, y sería este efecto similar o diferente de una mutación que inactivase la proteína receptora de KDEL?

**7.** ¿Cómo se marca una proteína lisosómica (p. ej., una hidrolasa lisosómica) para dirigirla al lisosoma?

**8.** ¿Qué efecto tendría la adición de una señal de destino lisosómico en la localización subcelular de una proteína que habitualmente es citosólica? ¿Cómo afectaría a la localización de una proteína que habitualmente es secretada?

**9.** ¿Cuál es el destino predecible de las hidrolasas ácidas lisosómicas en la enfermedad celular-I, en la que las células carecen de la enzima requerida para la formación de residuos de manosa-6-fosfato?

**10.** ¿Qué procesos resultan en la presencia de glicolípidos y esfingolípidos en la cara externa pero no en la interna de la bicapa de la membrana plasmática?

**11.** ¿Qué evidencias experimentales demostraron la existencia del transporte vesicular de proteínas entre las cisternas del Golgi?

**12.** Un paciente llega a su clínica con una acumulación de glucocerebrósidos en sus lisosomas. ¿Cuál es su diagnóstico, y qué terapia sugeriría si el precio no es un factor limitante?

## Bibliografía

### *Retículo endoplásmico*

Abeijon, C. and C. B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 32-36. [R]

Antonny, B. and R. Schekman. 2001. ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 438-443. [R]

Beckmann, R., D. R. Bubeck, P. Grassuci, A. Penczek, G. Verschoor, G. Blobel and J. Frank. 1997. Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278: 2123-2130. [P]

Bishop, W. R. and R. M. Bell. 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: Biosynthesis, transmembrane movement, and intracellular translocation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 580-610. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across the membrane. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835-851. [P]

Ellgaard, L. and A. Helenius. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 431-437. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Fiedler, K. and K. Simons. 1995. The role of *N*-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81: 309-312. [R]

Glick, B. S. 2001. ER export: more than one way out. *Curr. Biol.* 11: R361-R363. [R]

Haucke, V. 2003. Vesicle budding: A coat for the COPs. *Trends Cell Biol.* 13: 59-60. [R]

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 315-343. [R]

Matlack, K. E. S., B. Misselwitz, K. Plath and T. A. Rapoport. 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-α factor across the ER membrane. *Cell* 97: 553-564. [P]

Menon, A. K. 1995. Flippases. *Trends Cell Biol.* 5: 355-360. [R]

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358. [R]

Powers, T. and P. Walter. 1997. A ribosome at the end of the tunnel. *Science* 278: 2072-2073. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563-591. [R]

### *Aparato de Golgi*

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281-291. [P]

Barr, F. A. 2002. The Golgi apparatus: Going round in circles? *Trends Cell Biol.* 12: 101-104. [R]

Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler and D. E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 517-568. [R]

Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel. 1992. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613-616. [R]

Conibear, E. and T. H. Stevens. 1995. Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins. *Cell* 83: 513-516. [R]

Driouich, A., L. Faye and L. A. Staehelin. 1993. The plant Golgi apparatus: A factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 210-214. [R]

Farquhar, M. G. and G. E. Palade. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8: 2-10. [R]

Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99: 189-196. [P]

Glick, B. S. 2002. Can the Golgi form de novo? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 615-619. [R]

Hirschberg, C. B. and C. B. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63-87. [R]

Kirchhausen, T. 2002. Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109: 413-416. [R]

Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-664. [R]

Mostov, K., M. B. A. ter Beest and S. J. Chapin. 1999. Catch the m1B train to the basolateral surface. *Cell* 99: 121-122. [R]

Pearse, B. M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. J. Mol. Biol. 97: 93-98. [P]

Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 355: 409-415. [R]

Tooze, S. A., G. J. Martens and W. B. Huttner. 2001. Secretory granule biogenesis: Rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11: 116-122. [R]

Varki, A. 1998. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 8: 34-40. [R]

### *Mecanismo de transporte de vesículas*

Balch, W. E., W. G. Dunphy, W. A. Braeli and J. E. Rothman. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39: 405-416. [P]

Chen, Y. A. and R. H. Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 98-106. [R]

Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 721-730. [R]

Jahn, R., T. Lang and T. C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112: 519-533. [R]

Novick, P. and P. Brennwald. 1993. Friends and family: The role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75: 597-601. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205-215. [P]

Pelham, H. R. 2001. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* 11: 99-101. [R]

Pfeffer, S. 2003. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 112: 507-517. [R]

Rizo, J. and T. C. Sudhof. 2002. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 641-653. [R]

Segev, N. 2001. Ypt and Rab GTPases: Insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 500-511. [R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324. [P]

### *Lisosomas*

Dunn, W. A., Jr. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4: 139-143. [R]

Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar ($H^+$)-ATPases. *J. Biol. Chem.* 274: 12951-12954. [R]

Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 266: 21327-21330. [R]

Ghosh, P., N. M. Dahms and S. Kornfeld. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 202-213. [R]

Kornfeld, S. and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257-280. [R]

# 10

# Bioenergética y metabolismo

## Mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas



LOS ORGÁNULOS CITOPLÁSMICOS, ADEMÁS DE ESTAR IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE Y DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS, proporcionan compartimentos especializados en los que tienen lugar diversas actividades metabólicas. Una actividad fundamental de todas las células es generar energía metabólica, y son dos los orgánulos que están dedicados específicamente al metabolismo energético y a la producción de ATP. Las mitocondrias son responsables de generar la mayoría de la energía útil derivada de la degradación de los lípidos y de los carbohidratos, y los cloroplastos utilizan la energía obtenida de la luz solar para generar tanto ATP como poder reductor para sintetizar carbohidratos a partir de $CO_2$ y $H_2O$. El tercer orgánulo que se trata en este Capítulo, el peroxisoma, contiene enzimas que intervienen en diversas rutas metabólicas, incluyendo la degradación de los ácidos grasos y el metabolismo de un derivado de la fotosíntesis.

Las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas difieren de los orgánulos tratados en el Capítulo anterior no sólo en sus funciones, sino también en su mecanismo de formación. Las proteínas destinadas a los peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos, en lugar de sintetizarse en los ribosomas unidos a membrana y ser trasladadas al retículo endoplásmico, se sintetizan en los ribosomas libres del citosol y son importadas a sus orgánulos de destino en forma de cadenas polipeptídicas completas. Las mitocondrias y los cloroplastos también contienen sus propios genomas, que incluyen algunos genes que se transcriben y traducen en el propio orgánulo. Por lo tanto, la distribución de las proteínas a los orgánulos citoplásmicos tratados en este Capítulo es diferente de las rutas de transporte vesicular que conectan el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática.

## Mitocondrias

Las **mitocondrias** desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica en las células eucariotas. Como ya se comentó en el Capítulo 2, son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que es convertida en ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa. La mayoría de las proteínas mitocondriales son traducidas en los ribosomas citoplásmicos libres, y son importadas al orgánulo debido a señales directoras específicas. Además, las mitocondrias son únicas entre los orgánulos citoplásmicos ya tratados en que contienen su propio ADN,

que codifica ARNt, ARNr, y algunas proteínas mitocondriales. El ensamblaje de las mitocondrias implica, por tanto, a proteínas codificadas por su genoma propio y traducidas en el orgánulo, así como a proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas desde el citosol.

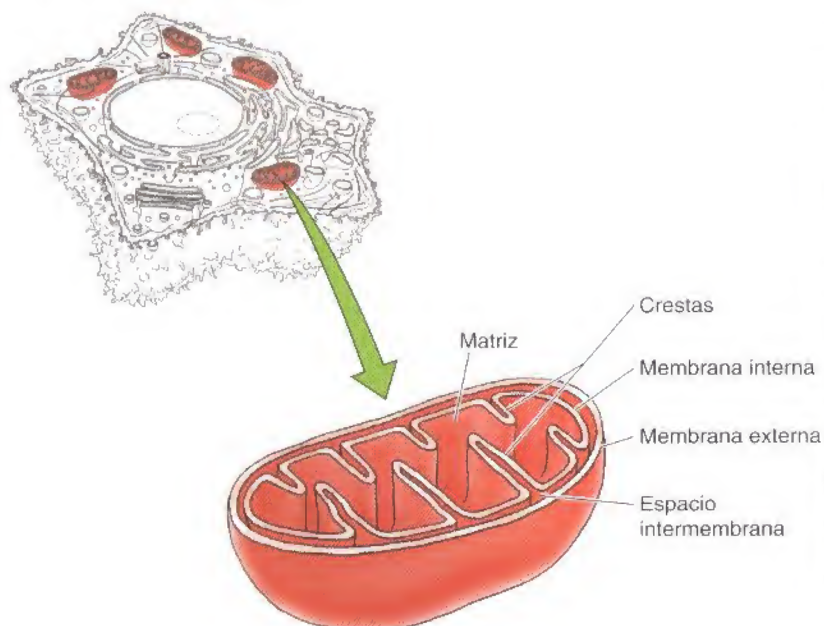
## *Organización y función de las mitocondrias*

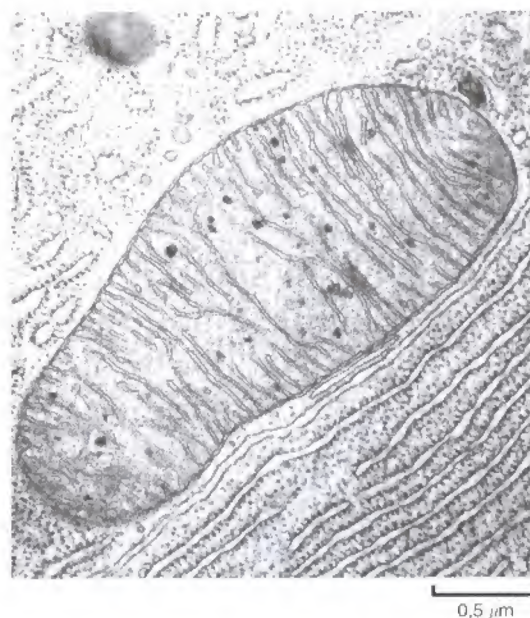
Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana (Fig. 10.1). La membrana interna forma numerosos pliegues (**crestas**), que se extienden hacia el interior (**o matriz**) del orgánulo. Cada uno de estos componentes desempeña un papel funcional distinto, siendo la matriz y la membrana interna los principales compartimentos funcionales de las mitocondrias.

La matriz contiene el sistema genético mitocondrial así como las enzimas responsables de las reacciones centrales del metabolismo oxidativo (Fig. 10.2). Como ya se trató en el Capítulo 2, la fuente principal de energía metabólica en las células animales es la degradación oxidativa de la glucosa y de los ácidos grasos. Las etapas iniciales del metabolismo de la glucosa (glicolisis) tienen lugar en el citoplasma, donde la glucosa es convertida a piruvato (véase Fig. 2.32). El piruvato es posteriormente transportado al interior de la mitocondria, donde su oxidación completa a $CO_2$ produce la mayor parte de la energía utilizable (ATP) procedente del metabolismo de la glucosa. Esto implica la oxidación inicial del piruvato a acetil CoA, que posteriormente es degradado hasta $CO_2$ a través del ciclo del ácido cítrico (véanse Figs. 2.33 y 2.34). La oxidación de los ácidos grasos también produce acetil CoA (véase Fig. 2.36), que de forma similar es metabolizado por el ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias. Por lo tanto, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (localizadas en la matriz mitocondrial) tienen un papel central en la degradación oxidativa tanto de los carbohidratos como de los ácidos grasos.

La oxidación del acetil CoA a $CO_2$ está acoplada a la reducción de $NAD^+$ y FAD a NADH y $FADH_2$ respectivamente. Por lo tanto, la mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo es producida por el proceso de fosforilación oxidativa (que se tratará en detalle en la siguiente sección), que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Los electrones de alta energía del NADH y $FADH_2$ se transfieren al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores de la membrana. La energía derivada de estas reacciones de transfe-

*Figura 10.1*
**Estructura de una mitocondria.** Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana interna y una externa. Los pliegues de la membrana interna (crestas) se extienden hacia el interior de la matriz. (Microfotografía por K.R. Porter/Photo Rechearches, Inc.)



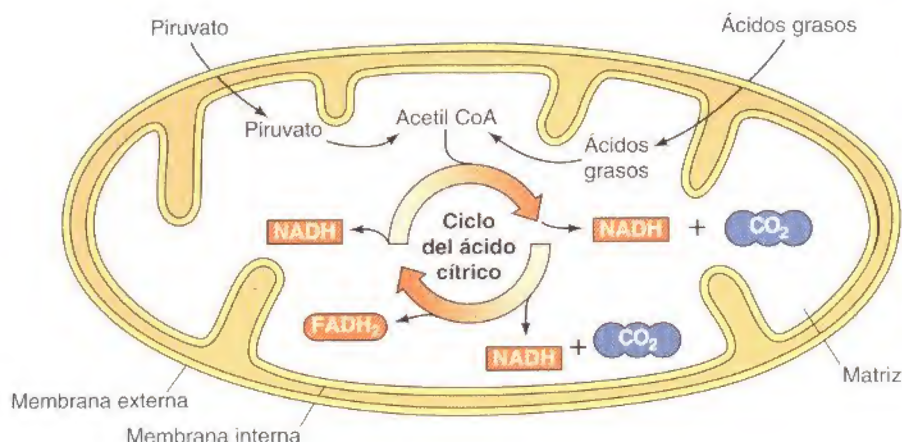



*Figura 10.2*
**Metabolismo en la matriz de las mitocondrias.** El piruvato y los ácidos grasos son importados desde el citosol y convertidos en acetil CoA en la matriz mitocondrial. El acetil CoA se oxida a $CO_2$ a través del ciclo del ácido cítrico, la ruta principal del metabolismo oxidativo.

rencia de electrones se convierte en energía potencial acumulada en forma de un gradiente de protones a través de la membrana, que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP. La membrana interna mitocondrial representa de esta manera el lugar principal de generación de ATP, y este papel fundamental se refleja en su estructura. Primero, el incremento de su superficie mediante su plegamiento en crestas. Además, la membrana interna mitocondrial contiene una proporción inhabitualmente elevada (mas del 70%) de proteínas, que intervienen en la fosforilación oxidativa así como en el transporte de metabolitos (p. ej., piruvato y ácidos grasos) entre el citosol y la mitocondria. Por otra parte, la membrana interna es impermeable a la mayoría de los iones y de las moléculas pequeñas —una propiedad crítica para mantener el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

A diferencia de la membrana interna, la membrana externa mitocondrial es completamente permeable a las moléculas pequeñas. Esto es debido a que contiene unas proteínas denominadas **porinas**, que forman canales que permiten la difusión libre de moléculas menores de 1.000 daltons. Por lo tanto, la composición del espacio intermembrana es similar a la del citosol respecto a los iones y a las moléculas pequeñas. Consecuentemente, la membrana mitocondrial interna es la barrera funcional para el paso de moléculas pequeñas entre el citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que dirige la fosforilación oxidativa.

## *Sistema genético de las mitocondrias*

Las mitocondrias contienen su propio sistema genético, el cual está separado y es distinto del genoma nuclear de la célula. Como ya se comentó en el Capítulo 1, se cree que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias que desarrollaron una relación simbiótica viviendo dentro de células más grandes (**endosimbiosis**). Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente por los resultados del análisis de secuencias de ADN, que han revelado similitudes notables entre el genoma de las mitocondrias y el de la bacteria *Rickettsia prowazekii*. Las rickettsias son parásitos intracelulares que, al igual que las mitocondrias, sólo son capaces de reproducirse dentro de células eucariotas. De acuerdo con sus estilos de vida similares simbióticos, las secuencias de ADN genómico de *Rickettsia* y de las mitocondrias sugieren que compartieron un ancestro común, a partir del cual se originó el sistema genético de las mitocondrias actuales.

El genoma mitocondrial está constituido por moléculas circulares de ADN, como los de las bacterias, presentes en varias copias por orgánulo. Varían considerablemente en tamaño entre las diferentes especies. Los genomas de las mitocondrias humanas y de la mayoría de los animales tienen sólo alrededor de16 kb, pero se han encontrado genomas mitocondriales sustancialmente más grandes en las levaduras (aproximadamente 80 kb) y en las plantas (más de 200

*Figura 10.3*
**Genoma mitocondrial humano.** El genoma contiene 13 secuencias codificadoras de proteínas, que son designadas como componentes de los complejos respiratorios I, III, IV, o V. Además, el genoma contiene genes para los ARNr 12S y 16S y para 22 ARNt, que son designados por el código de una letra para el aminoácido correspondiente. La región del genoma designada «bucle D» contiene un origen de replicación del ADN y secuencias promotoras de la transcripción.

kb). Sin embargo, estos genomas mitocondriales más grandes están compuestos fundamentalmente por secuencias no codificantes y no parece que contengan mucha más información genética. Por ejemplo, el genoma mitocondrial más grande secuenciado es el de la planta *Arabidopsis thaliana*. Aunque el ADN mitocondrial de *Arabidopsis* tiene alrededor de 367 kb, codifica sólo 32 proteínas: un poco más del doble de las que codifica el ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial con mayor número de genes es el del protozoo *Reclinomonas americana*, que tiene 69 kb y contiene 97 genes. El genoma mitocondrial de *Reclinomonas* parece que se asemeja más al genoma bacteriano del que evolucionaron las mitocondrias que la mayoría de los genomas mitocondriales actuales, que sólo codifican un pequeño número de proteínas que son componentes esenciales del sistema de fosforilación oxidativa. Además, el genoma mitocondrial codifica todos los ARNs ribosómicos y la mayoría de los ARNs de transferencia necesarios para la traducción en la mitocondria de estas secuencias codificantes. Otras proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares; se piensa que éstas han sido transferidas al núcleo desde el genoma mitocondrial ancestral.

El genoma mitocondrial humano codifica 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Fig. 10.3). Además, el ADN mitocondrial humano codifica ARNr 16S y 12S y 22 ARNt que se requieren para la traducción de las proteínas codificadas por el genoma del orgánulo. Los dos ARNr son los únicos componentes de ARN de los ribosomas mitocondriales de los animales y levaduras, mientras que los ribosomas bacterianos contienen tres ARNr (23S, 16S y 5S). Sin embargo, el ADN mitocondrial de las plantas también codifica un tercer ARNr de 5S. Las mitocondrias de las plantas y de los protozoos también difieren de las de los animales en que importan y utilizan ARNt codificados tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial, mientras que en las mitocondrias animales todos los ARNt son codificados por el orgánulo.

El pequeño número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial pone de manifiesto una característica importante del sistema genético mitocondrial —el uso de un código genético ligeramente diferente, que es distinto del código genético «universal» utilizado por las células procariotas y eucariotas (Tabla 10.1). Como ya se trató en el Capítulo 3, hay 64 codones posibles, de los cuales 61 codifican los 20 aminoácidos diferentes incorporados en las proteínas (véase Tabla 3.1). Muchos ARNt tanto en las células procariotas como en las eucariotas son capaces de reconocer más de un único codón en el ARNm debido al «balanceo», que permite el desapareamiento entre el anticodón del ARNt y la tercera posición de determinados codones complementarios (véase Fig. 7.3). Sin embargo, se requieren al menos 30 ARNt diferentes para traducir el código universal de acuerdo a las reglas del balanceo. Sin embargo, el ADN mitocondrial humano codifica sólo 22 especies de ARNt, y estos son los únicos ARNt que se utilizan para la traducción de los ARNm mitocondriales. Esto se lleva a cabo por una forma extrema de balanceo en la que la U en el anticodón del ARNt puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del codón de ARNm, lo que permite que un único ARNt reconozca cuatro codones. Además, en las mitocondrias algunos codones especifican aminoácidos distintos de los que codifica el código universal.

Al igual que el ADN de los genomas nucleares, el ADN mitocondrial puede alterarse por mutaciones, que frecuentemente son nocivas para el orgánulo. Puesto que casi todas las mitocondrias del óvulo fecundado las aporta el oocito en vez del espermatozoide, las mutaciones germinales en el ADN mitocondrial son transmitidas a la siguiente generación por la madre. Dichas mutaciones se han asociado con varias enfermedades. Por ejemplo, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, una enfermedad que conduce a la ceguera, puede producirse por mutaciones en los genes mitocondriales que codifican los componentes de la cadena de transporte de electrones. Además, se ha sugerido que la acumulación progresiva de mutaciones en el ADN mitocondrial durante la vida de los individuos contribuye al proceso de envejecimiento.

**TABLA 10.1.** Diferencias entre los códigos genéticos universal y mitocondrial

| Codón | Código universal | Código mitocondrial humano |
|---|---|---|
| UGA | Terminación | Trp |
| AGA | Arg | Terminación |
| AGG | Arg | Terminación |
| AUA | Ile | Met |

En las mitocondrias de las levaduras y las plantas hay otros codones que difieren del código universal.

### *Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias*

A diferencia de lo que sucede con los ARN miembros del aparato de traducción de las mitocondrias (ARNr y ARNt), la mayoría de los genomas mitocondriales no codifican las proteínas requeridas para la replicación, transcripción o traducción del ADN. Los genes que codifican las proteínas requeridas para la replicación y expresión del ADN mitocondrial se encuentran en el núcleo. Además, el núcleo contiene los genes que codifican la mayoría de las proteínas mitocondriales requeridas para la fosforilación oxidativa y todas las enzimas que intervienen en el metabolismo mitocondrial (p. ej., las enzimas del ciclo del ácido cítrico). Las proteínas codificadas por estos genes (más del 95 % de las proteínas mitocondriales) son sintetizadas en ribosomas citosólicos libres e introducidas en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completas. Debido a la estructura de doble membrana de las mitocondrias, la internalización de las proteínas es considerablemente más complicada que la transferencia de un polipéptido a través de una única bicapa fosfolipídica. Las proteínas destinadas a la matriz tienen que atravesar tanto la membrana mitocondrial interna como la externa, mientras que otras proteínas han de distribuirse a distintos compartimentos en el orgánulo (p. ej., el espacio intermembrana).

La internalización de proteínas a la matriz es el aspecto mejor conocido de la distribución de las proteínas en la mitocondria (Fig. 10.4). La mayoría de las proteínas son marcadas y dirigidas a la mitocondria mediante secuencias amino terminales de 20 a 35 aminoácidos (denominadas **presecuencias**) que se escinden por rotura proteolítica tras entrar en el orgánulo. Las presecuencias de las proteínas mitocondriales, caracterizadas por primera vez por Gottfried Schatz, contienen múltiples residuos de aminoácidos con carga positiva, habitualmente en forma de hélice $\alpha$ anfipática. El primer paso en la internalización de la proteína es la unión de estas presecuencias a receptores en la superficie de la mitocondria. A continuación la cadena polipeptídica se inserta en un complejo proteínico que dirige la translocación a través de la membrana externa (la translocasa de la membrana externa o **complejo Tom**). Las proteínas Tom individuales se designan de acuerdo con su tamaño molecular, de modo que los receptores se denominan Tom22, Tom20 y Tom5. Desde estos receptores, las proteínas son transferidas a la proteína del poro Tom40 y son translocadas a través de la membrana externa. Las proteínas a continuación son transferidas a un segundo complejo proteico en la membrana interna (una de dos translocasas diferentes de la membrana interna o **complejos Tim**). Las proteínas con presecuencias atraviesan la membrana interna a través del complejo Tim23. La translocación de proteínas requiere el potencial electroquímico que se establece a través de la membrana interna mitocondrial durante el transporte de electrones. Como se verá en la siguiente sección de este Capítulo, la transferencia de electrones de alta energía desde el NADH y $FADH_2$ al oxígeno molecular está acoplada a la transferencia de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Puesto que los protones son partículas cargadas, esta transferencia establece un potencial eléctrico a través de la membrana interna, siendo la matriz negativa. Durante la internalización de las proteínas, este potencial eléctrico dirige la translocación de la presecuencia cargada positivamente.

Para ser trasladadas a través de la membrana mitocondrial, las proteínas deben estar, al menos parcialmente, desplegadas. Por lo tanto, la internalización de las proteínas en las mitocondrias requiere chaperonas moleculares además de las proteínas de membrana implicadas en la translocación (véase Fig. 10.4). En el lado citoplásmico, los miembros de la familia de chaperonas Hsp70 mantienen las proteínas parcialmente desplegadas para que puedan ser insertadas en la membrana mitocondrial. A medida que cruzan la membrana interna, las cadenas polipeptídicas sin plegar se unen a otro miembro de la familia Hsp70, que está asociado con el complejo Tim23 y actúa como un motor que emplea la hidrólisis repetida de ATP para conducir la internalización de proteínas.

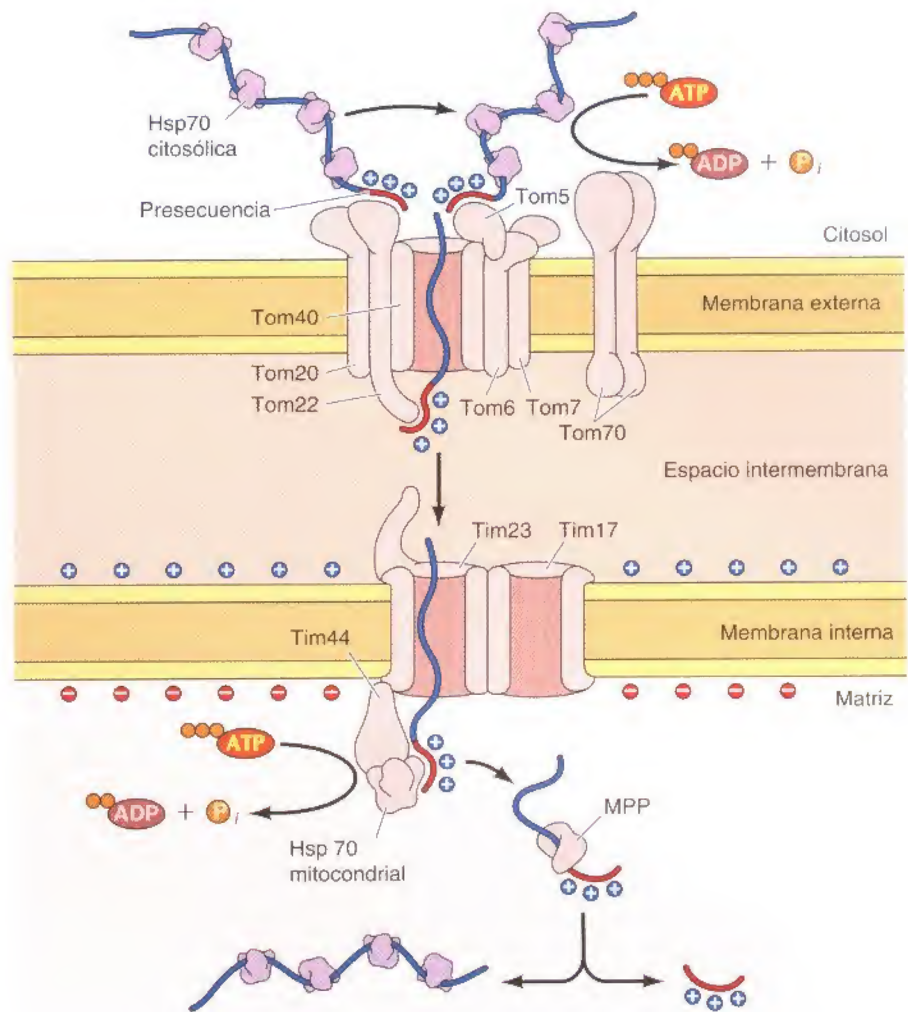



*Figura 10.4*
**Internalización de proteínas de la matriz mitocondrial.** Las proteínas se dirigen al complejo Tom en la membrana mitocondrial externa por presecuencias aminoterminales que poseen aminoácidos cargados positivamente. Esta presecuencia se une en primer lugar a Tom20 y Tom22, y a continuación se transfiere a Tom5 y el poro de internalización, Tom40. Después de atravesar la membrana externa, la presecuencia se une al dominio intermembrana de Tom22 y pasa al complejo Tim23 en la membrana interna. En la matriz, una chaperona Hsp70 asociada con Tim44 actúa como motor, empleando la hidrólisis de ATP para translocar la proteína a través de la membrana interna. En la mayoría de las proteínas destinadas para la matriz mitocondrial, se elimina la presecuencia por una peptidasa procesadora de la matriz (MPP) y se asocian con proteínas Hsp70 solubles que facilitan su plegamiento.

En la mayoría de los casos, la presecuencia es entonces escindida por una **peptidasa procesadora de la matriz (MPP: *matrix processing peptidase*)** y la cadena polipeptídica se une a otras chaperonas Hsp70 de la matriz que facilitan su plegamiento. Algunos polipéptidos se transfieren a continuación a una chaperona de la familia Hsp60 (una chaperonina, véase Fig. 7.21), en cuyo interior se producen plegamientos proteicos adicionales. Estas interacciones de cadena polipeptídicas con chaperonas moleculares dependen de ATP, de modo que la internalización de proteínas requiere ATP tanto fuera como en el interior de las mitocondrias, además del potencial eléctrico a través de la membrana interna.

Como se ha mencionado previamente, algunas proteínas mitocondriales se dirigen a la membrana externa, a la membrana interna o al espacio intermembrana en lugar de a la matriz, por lo que se requieren mecanismos adicionales para dirigir estas proteínas al compartimento submitocondrial correcto. Muchas de las proteínas de la membrana interna son transportadoras de moléculas pequeñas que intercambian nucleótidos e iones entre la mitocondria y el citosol. Estas proteínas no contienen presecuencias, por el contrario poseen múltiples secuencias de internalización en la mitocondria interna. En consecuencia, no son reconocidas por Tom20 ni Tom22. Estas proteínas son reconocidas por un receptor distinto en la membrana mitocondrial externa (Tom70), y a continuación son translocadas por la membrana a través de Tom40 (Fig. 10.5). En el espacio intermembrana, las proteínas son reconocidas por componentes móvi-

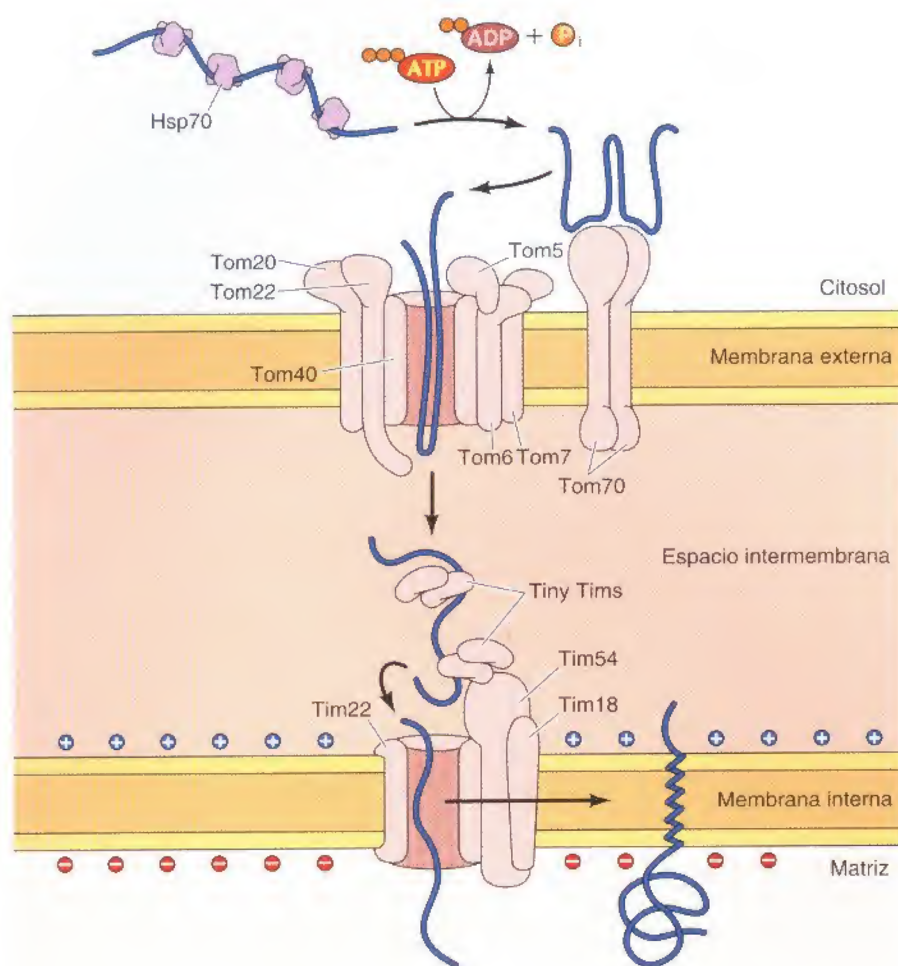
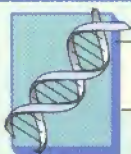



*Figura 10.5*

**Internalización de proteínas transportadoras de moléculas pequeñas en la membrana mitocondrial interna.** Estas proteínas poseen secuencias de señal interna, en lugar de presecuencias N-terminales. Las secuencias de señal interna son reconocidas por receptores Tom70 que transfieren a la proteína al poro de internalización de Tom40. En el espacio intermembrana, la proteína se une a las proteínas pequeñas móviles Tim, las proteínas «*tiny Tim*», que la guían al complejo Tim22 de la membrana interna. Las proteínas *tiny Tim* transfieren la proteína a Tim54 y a continuación, al poro de internalización de Tim22. Las secuencias internas de detención de la transferencia detienen la translocación y la proteína se transfiere lateralmente al interior de la membrana mitocondrial interna.

les de un complejo Tim diferente, el complejo Tim22. Estas proteínas Tim pequeñas (denominadas proteínas «*tiny Tim*») funcionan como chaperonas y como transportadoras que escoltan proteínas hasta Tim22. A continuación, estas proteínas son parcialmente translocadas a través de Tim22, antes de que señales internas de detención de la transferencia causen su salida lateral del poro de Tim22 y su inserción en la membrana interna.

Otras proteínas con destino en la membrana externa, interna o el espacio intermembrana poseen tanto una señal presecuencia como una secuencia de señal interna. Puesto que contienen presecuencias, estas proteínas son reconocidas por los receptores Tom20 y Tom22 en la membrana externa y translocadas por la membrana interna a través del complejo Tim23 (Fig. 10.6). Algunas de estas proteínas salen lateralmente del complejo Tom a la membrana externa; otras pasan a través de la membrana externa pero permanecen en el espacio intermembrana en lugar de penetrar en Tim23. Otras proteínas destinadas al espacio intermembrana, además de algunas proteínas de la membrana interna, son transportadas en primer lugar a través de la membrana interna a la matriz mitocondrial. A continuación, son marcadas para su posterior transporte con una segunda señal que se descubre tras la eliminación de la presecuencia en la matriz. Esta segunda señal las dirige a una tercera translocasa, Oxa1, donde pasan al interior al espacio intermembrana o son detenidas en su tránsito por señales de detención de la transferencia e insertadas en la membrana interna. Oxa1 es también la translocasa para aquellas proteínas intermembrana y de



Medicina molecular

# Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber

## La enfermedad

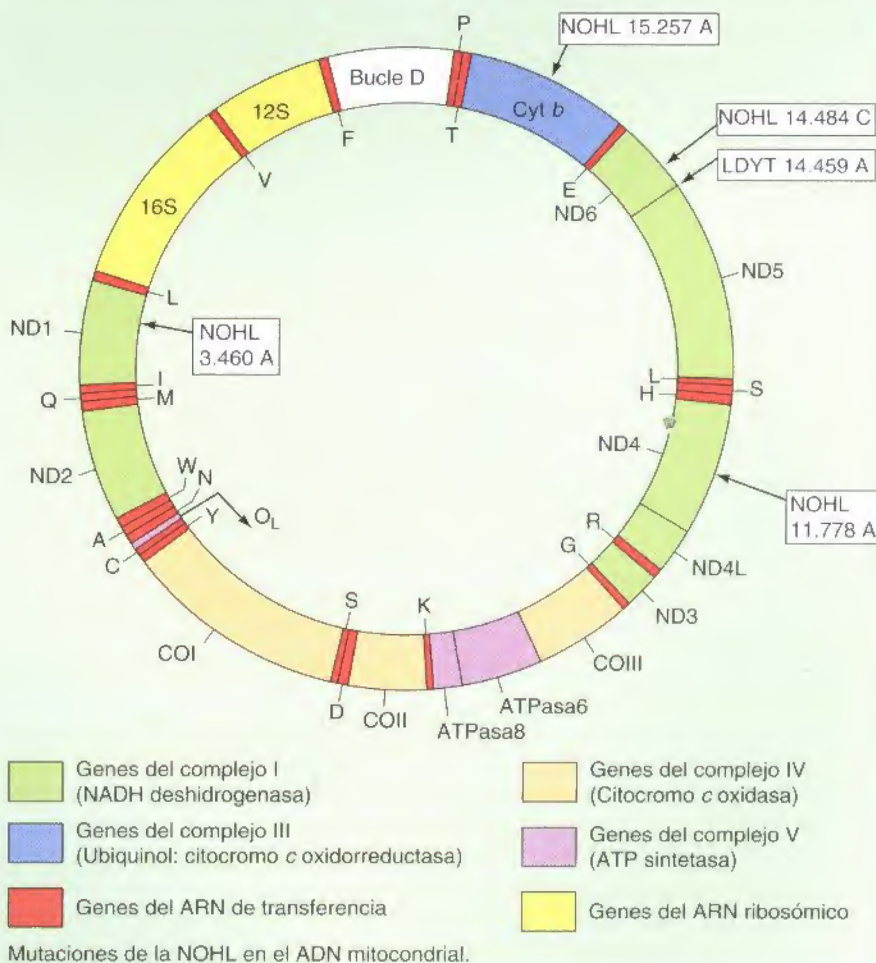
La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una enfermedad hereditaria poco frecuente que causa ceguera como consecuencia de la degeneración del nervio óptico. La pérdida de la visión suele ocurrir entre los 15 y los 35 años, y generalmente es la única manifestación de la enfermedad. No todos los individuos que heredan los defectos genéticos responsables de la NOHL desarrollan la enfermedad, y ésta afecta con menor frecuencia a las mujeres que a los hombres. Esta tendencia a afectar a los hombres podría sugerir que la NOHL es una enfermedad ligada al cromosoma X. Sin embargo, esto no es así, ya que los hombres nunca transmiten la NOHL a su descendencia. Por el contrario, la NOHL siempre es transmitida por la madre. Esta característica concuerda con una herencia de la NOHL citoplásmica en lugar de nuclear, ya que el citoplasma de los óvulos fecundados procede casi por completo del oocito.

## Bases moleculares y celulares

En 1988 Douglas Wallace y sus colaboradores identificaron una mutación en el ADN mitocondrial de los pacientes con NOHL. Esta mutación (en el par de bases 11.778) afecta a una de las subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones (NADH deshidrogenasa), y causa la sustitución de una histidina por una arginina. La mutación 11.778 es responsable de cerca de la mitad de todos los casos de NOHL. Otras tres mutaciones del ADN mitocondrial han sido también identificadas como causas primarias de la NOHL. Dos de estas mutaciones afectan a otras subunidades del complejo I, mientras que la tercera afecta al citocromo *b*, que es un componente del complejo III (véase Fig.). En total, estas cuatro mutaciones son responsables de más del 80 % de los casos de NOHL. Una quinta mutación (en el par de bases 14.459), que afecta a una subunidad del complejo I, puede producir NOHL o enfermedades musculares.

Las mutaciones que producen la NOHL disminuyen la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y generar ATP. Esto tiene su efecto principal en aquellos tejidos que son más dependientes de la fosforilación oxidativa, por lo que las alteraciones en los componentes de las mitocondrias darán lugar a manifestaciones clínicas en órganos específicos, en vez de a una enfermedad sistémica. El sistema nervioso central (incluyendo el cerebro y el nervio óptico) es muy dependiente del metabolismo oxidativo, por lo que concuerda que la ceguera sea la principal manifestación clínica debida a las mutaciones del ADN mitocondrial responsables de la NOHL.

Como ya se ha mencionado, la herencia de mutaciones de la NOHL no siempre conduce al desarrollo de la enfermedad; sólo alrededor del 10 % de las mujeres y el 50 % de los hombres que poseen una mutación sufren la pérdida de la visión. Un factor que puede contribuir a esta baja incidencia de la enfermedad entre los portadores de las mutaciones de la NOHL es que cada célula contiene miles de copias del ADN mitocondrial, que pueden estar presentes en una mezcla de mitocondrias mutantes y normales. Estas mitocondrias se distribuyen de manera aleatoria a las células hijas en la división celular, por lo que la población de mitocondrias puede cambiar a medida que las células se dividen, dando lugar a células que



Mutaciones de la NOHL en el ADN mitocondrial.

### Enfermedades de las mitocondrias: neuropatía óptica hereditaria de Leber (continuación)

contienen proporciones mayores o menores de orgánulos mutantes. Sin embargo, muchos individuos que portan predominantemente ADNs mitocondriales mutantes tampoco desarrollan la enfermedad. Por lo tanto, parece que otros factores genéticos o ambientales, que aún no han sido identificados, desempeñan un papel significativo en el desarrollo de la NOHL.

#### Prevención y tratamiento

La identificación de las mutaciones del ADN mitocondrial responsables de la NOHL permite el diagnóstico molecular de la enfermedad, el cual puede ser importante para establecer un diagnóstico definitivo de los pacientes sin antecedentes familiares. Sin embargo, la detección de mutaciones en el ADN mitocondrial es de escaso valor para localizar a los miembros de las familias afectadas o para una planificación familiar. Esto contrasta con la utilidad para detectar mutaciones congénitas de los genes nucleares, donde el análisis molecular puede determinar si un miembro de la familia o un embrión ha heredado un alelo mutante o normal. En la NOHL, sin embargo, las mitocondrias mutantes están presentes en un número elevado y son transmitidas por vía materna a todos los descendientes. Como ya se ha dicho, no todos los descendientes desarrollan la enfermedad, pero esto no puede predecirse mediante el análisis genético.

El hallazgo de que la NOHL está producida por mutaciones del ADN mitocondrial hace pensar en el potencial de nuevos tratamientos. Una aproximación es el tratamiento metabólico dirigido a mejorar la fosforilación oxidativa mediante la administración de sustratos o cofactores de la vía de transporte de electrones, como succinato o coenzima Q. Otra posibilidad que se ha considerado para el tratamiento de la NOHL es la terapia génica mediante la que se colocaría un alelo de un gen normal en el núcleo. Se añadiría una señal apropiada para dirigir el producto del gen a la mitocondria, donde podría sustituir a la proteína codificada por la mitocondria defectuosa.

#### Referencias

Brown, MD, D.S. Voljavec, M. Lott, I. MacDonald and D.C. Wallace, 1992. Leber's hereditary optic neuropathy: A model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.* 6: 2791-2799.

Riordan-Eva, P. A. E. Harding, 1995. Leber's hedreditary optic: neuropthy. The clinical relevance of different mitochondrial DNA mustations. *J. Med. Genet.* 32: 81-87.

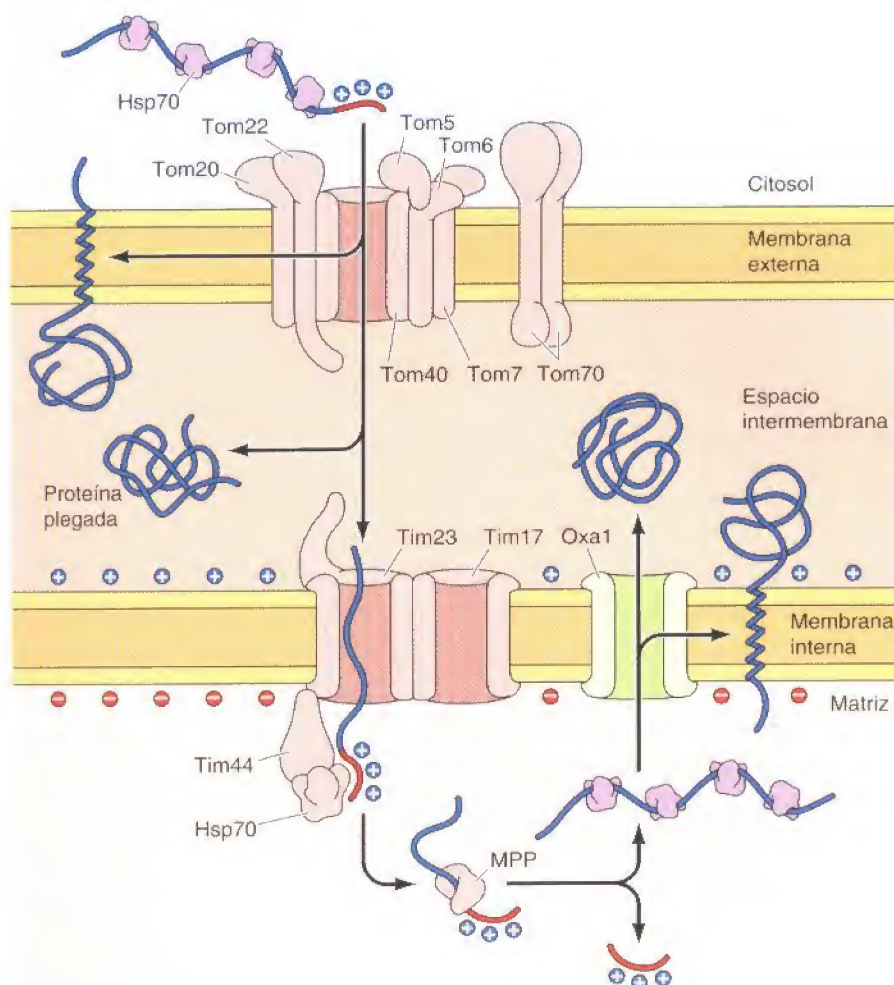
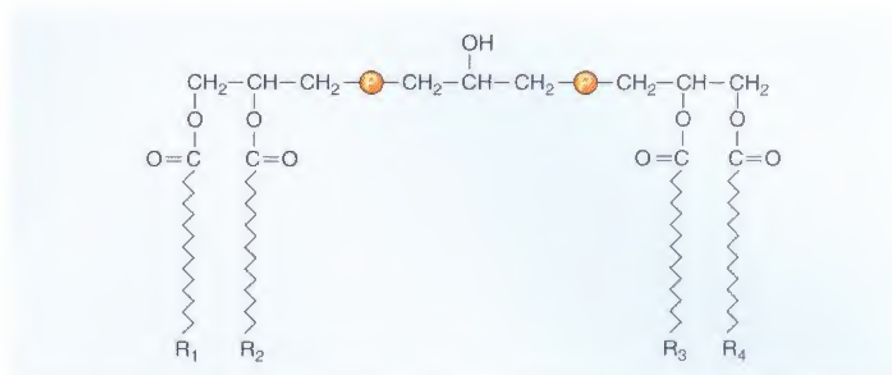



*Figura 10.6*
**Distribución de proteínas que contienen presecuencias a los distintos compartimentos mitocondriales.** Las proteínas mitocondriales con presecuencias N-terminales pueden ser internalizadas en la membrana externa, la membrana interna o el espacio intermembrana. Las presecuencias de estas proteínas son reconocidas por receptores Tom20 y Tom22 y transferidas a Tom40. Las proteínas destinadas a la membrana externa detienen la translocación en el complejo Tom40 y pasan lateralmente al interior de la membrana. Algunas proteínas destinadas al espacio intermembrana son translocadas a través de Tom40, pero permanecen en el espacio intermembrana en lugar de interaccionar con el complejo Tim23. Otras proteínas son transferidas a través de Tim23 a la matriz mitocondrial. La eliminación de la presecuencia en el interior de la matriz deja expuesta una segunda señal que dirige a estas proteínas de nuevo a la membrana interna o el espacio intermembrana a través del poro de translocación Oxa1.

*Figura 10.7*
**Estructura de la cardiolipina.** La cardiolipina es un fosfolípido «doble» poco frecuente, que se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna.




la membrana interna codificadas por el genoma mitocondrial, que son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales de la matriz.

No sólo las proteínas, sino también los fosfolípidos de las membranas mitocondriales son importados desde el citosol. En las células animales, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina se sintetizan en el RE y se transportan a las mitocondrias mediante **proteínas de transferencia de fosfolípidos**, que extraen moléculas aisladas de fosfolípidos de la membrana del RE. Entonces el lípido puede transportarse a través del ambiente acuoso del citosol, protegido por el sitio de unión hidrofóbico de la proteína, y liberarse cuando el complejo llega a una nueva membrana, como la de las mitocondrias. Las mitocondrias sintetizan fosfatidilserina a partir de fosfatidiletanolamina, y además catalizan la síntesis del fosfolípido poco frecuente cardiolipina, que contiene cuatro cadenas de ácidos grasos (Fig. 10.7).

## Mecanismo de la fosforilación oxidativa

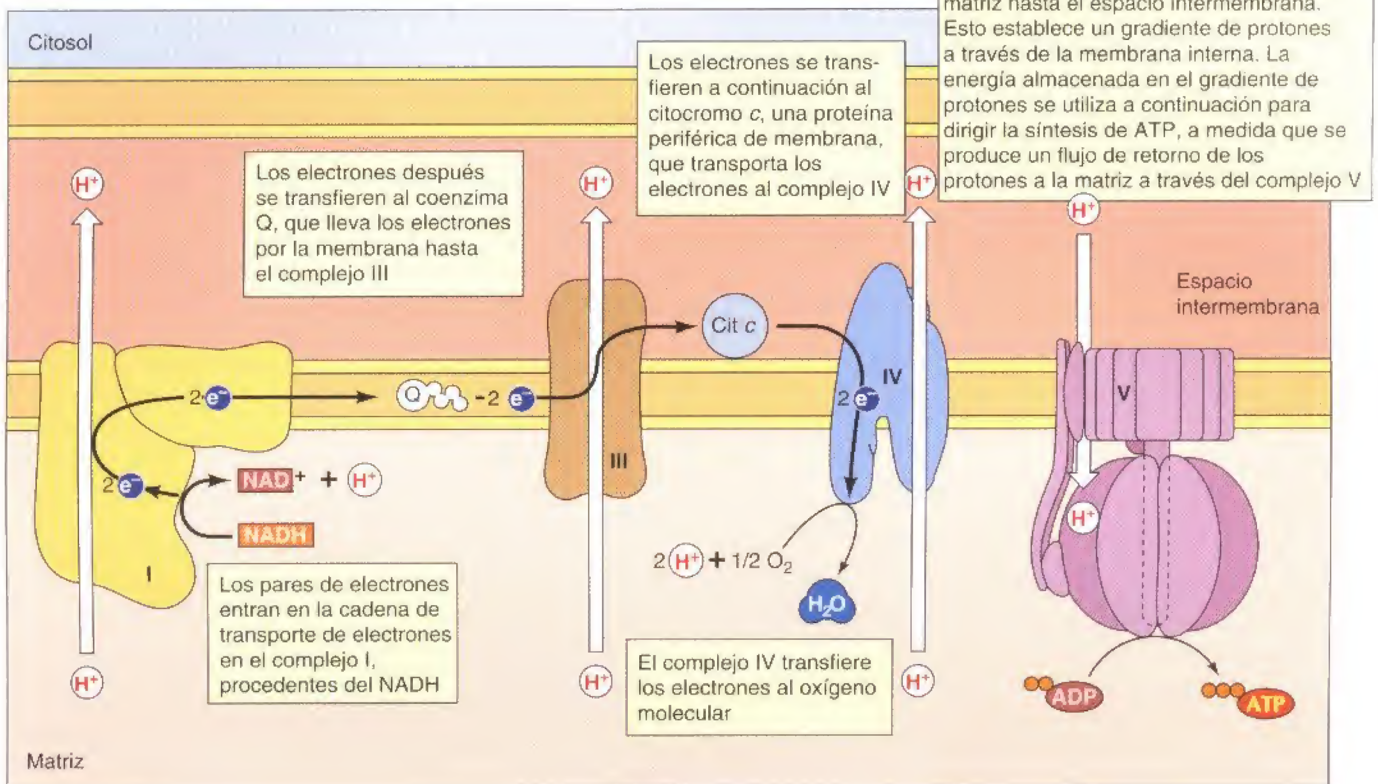
La mayor parte de la energía utilizable obtenida de la degradación de los hidratos de carbono o de las grasas, deriva de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en el interior de la mitocondria. Por ejemplo, la degradación de la glucosa mediante la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico rinde un total de cuatro moléculas de ATP, diez moléculas de NADH, y dos moléculas de $FADH_2$ (véase Cap. 2). Los electrones del NADH y del $FADH_2$ son transferidos después al oxígeno molecular, lo cual está acoplado a la formación de 32 a 34 moléculas adicionales de ATP mediante la fosforilación oxidativa. El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa son actividades críticas de los complejos de las proteínas de la membrana mitocondrial interna, que puede considerarse como la fuente principal de energía celular.

### *Cadena de transporte de electrones*

Durante la **fosforilación oxidativa** los electrones derivados del NADH y $FADH_2$ se combinan con el $O_2$, y la energía liberada de estas reacciones de oxidación/-reducción es utilizada para dirigir la síntesis de ATP a partir del ADP. La transferencia de electrones desde el NADH al $O_2$ es una reacción que desprende mucha energía, con una $\Delta G^{\circ\prime}$ = –52,5 kcal/mol por cada par de electrones transferidos. Para poderse utilizar, esta energía debe producirse gradualmente, mediante el paso de los electrones a través de una serie de transportadores que constituyen la **cadena de transporte de electrones**. Estos transportadores están organizados en cuatro complejos en la membrana mitocondrial interna. Un quinto complejo de proteínas sirve después para acoplar las reacciones del transporte de electrones, productoras de energía, a la síntesis de ATP.

Los electrones del NADH entran en la cadena de transporte de electrones en el complejo I, constituido aproximadamente por 40 cadenas polipeptídicas (Fig. 10.8).

*Figura 10.8*
**Transporte de electrones desde el NADH.**




Estos electrones primero se transfieren desde el NADH a un mononucleótido de flavina, y después, a través de un transportador de hierro-azufre, a la coenzima Q —un proceso que desprende energía con una $\Delta G^{\circ\prime} = -16{,}6$ kcal/mol—. La **coenzima Q** (también denominada **ubiquinona**) es una molécula pequeña, liposoluble, que transporta los electrones desde el complejo I, a través de la membrana, hasta el complejo III, que está constituido aproximadamente por 10 polipéptidos. En el complejo III los electrones se transfieren desde el citocromo *b* al citocromo *c* —una reacción que libera energía con una $\Delta G^{\circ\prime} = -10{,}1$ kcal/mol—. El **citocromo *c***, una proteína de membrana periférica, unida a la cara externa de la membrana interna, transporta a continuación los electrones al complejo IV (**citocromo oxidasa**), donde finalmente son transferidos al $O_2$ ($\Delta G^{\circ\prime} = -25{,}8$ kcal/mol).

Un complejo de proteínas diferente (complejo II), constituido por cuatro polipéptidos, recibe los electrones del succinato, que es un producto intermediario del ciclo del ácido cítrico (Fig. 10.9). Estos electrones son transferidos al $FADH_2$, en lugar de al NADH, y después a la coenzima Q. Desde la coenzima Q los electrones se transfieren al complejo III y después al complejo IV, como ya se ha descrito. A diferencia de la transferencia de electrones desde el NADH a la

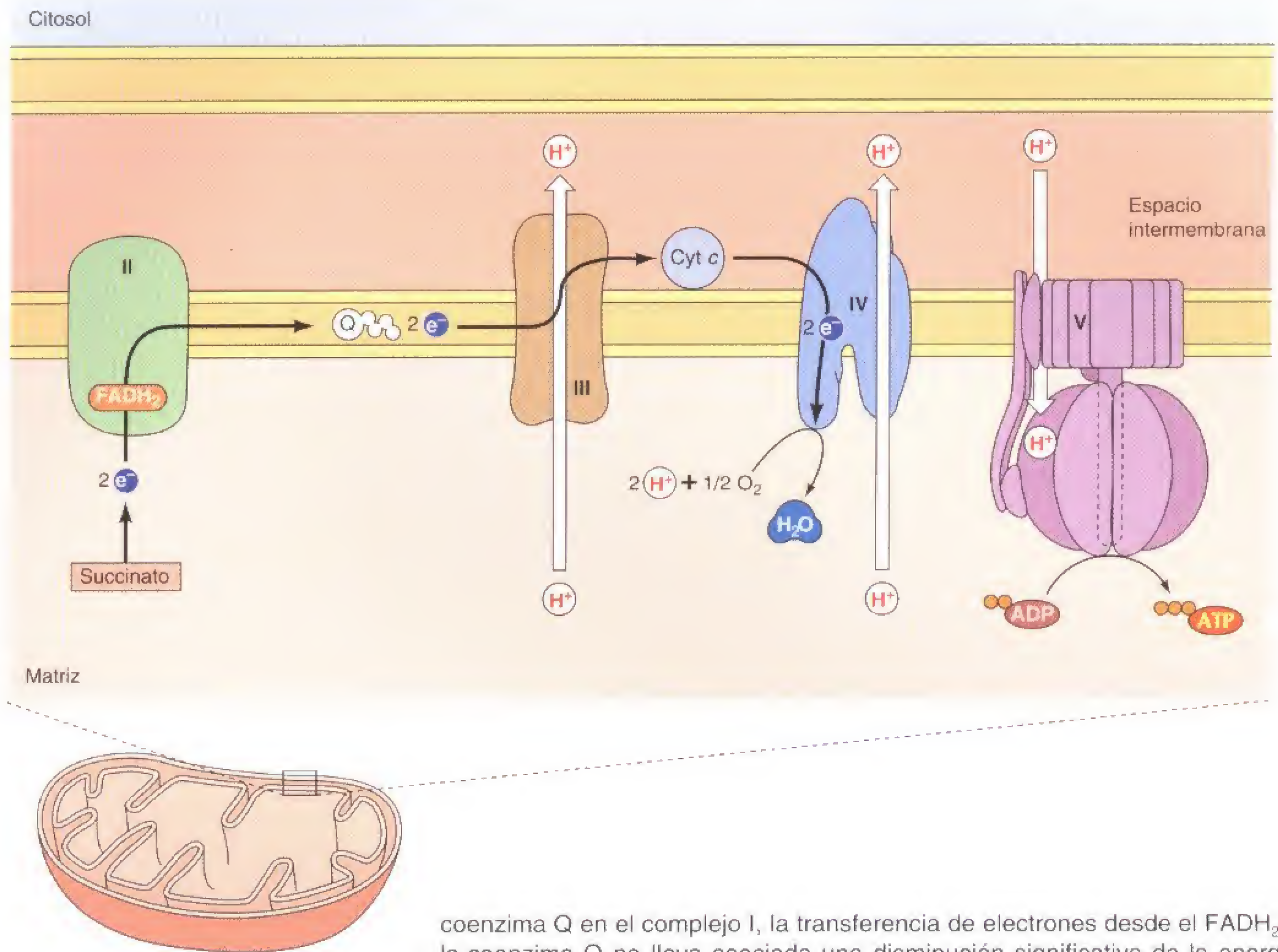



*Figura 10.9*
**Transporte de electrones desde el $NADH_2$.** Los electrones procedentes del succinato entran en la cadena transportadora de electrones a través del $FADH_2$ en el complejo II. A continuación son transferidos al coenzima Q y transportados a lo largo del resto de la cadena transportadora de electrones como se describió en la Figura 10.8. La transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución significativa de la energía libre, por lo que en el complejo II no se bombean protones a través de la membrana.

coenzima Q en el complejo I, la transferencia de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q no lleva asociada una disminución significativa de la energía libre, por lo que no está acoplada a la síntesis de ATP. Por lo tanto, el paso de los electrones derivados del $FADH_2$ a través de la cadena de transporte de electrones sólo rinde energía libre en los complejos III y IV.

La energía libre derivada del paso de electrones a través de los complejos I, III, y IV se obtiene al acoplarse con la síntesis de ATP. Es importante destacar que el mecanismo por el que la energía derivada de estas reacciones de transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP, es fundamentalmente diferente de la síntesis de ATP durante la glicólisis o el ciclo del ácido cítrico. En estos últimos, un fosfato rico en energía se transfiere directamente al ADP desde otro sustrato, en una reacción que libera energía. Por ejemplo, en la reacción final de la glicólisis, el fosfato rico en energía del fosfoenolpiruvato es transferido al ADP, dando lugar a piruvato más ATP (véase Fig. 2.32). Esta transferencia directa de grupos fosfato de alta energía no tiene lugar durante el transporte de electrones. En su lugar, la energía derivada del transporte de electrones está acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico que acopla el flujo, energéticamente favorable, de los protones a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

## *Acoplamiento quimiosmótico*

El mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones a la generación de ATP, el **acoplamiento quimiosmótico**, es un ejemplo significativo de la relación entre estructura y función en la biología celular. La hipótesis del acopla-

miento quimiosmótico fue propuesta por primera vez en 1961 por Peter Mitchell, quien sugirió que el ATP se genera utilizando la energía almacenada en forma de un gradiente de protones a través de las membranas biológicas, en lugar de por una transferencia química directa de grupos ricos en energía. Inicialmente, los bioquímicos fueron muy escépticos con este planteamiento, y la hipótesis quimiosmótica tardó más de una década en ganar la aceptación general de la comunidad científica. Sin embargo, con el tiempo se acumuló una evidencia abrumadora a su favor, y actualmente el acoplamiento quimiosmótico se reconoce como un mecanismo general de generación de ATP, que interviene no sólo en las mitocondrias sino también en los cloroplastos y en las bacterias, donde se genera ATP mediante un gradiente de protones a través de la membrana plasmática.

El transporte de electrones a través de los complejos I, III y IV está acoplado al transporte de protones fuera del interior de la mitocondria (véase Fig. 10.8). Por lo tanto, las reacciones del transporte de electrones que liberan energía están acopladas a la transferencia de protones desde la matriz al espacio intermembrana, lo que establece un gradiente de protones a través de la membrana interna. Los complejos I y IV parece que actúan como bombas de protones, que tranfieren protones a través de la membrana como consecuencia de cambios conformacionales inducidos por el transporte de electrones. En el complejo III, los protones son transportados a través de la membrana mediante la coenzima Q, que acepta protones de la matriz en los complejos I y II y los libera en el espacio intermembrana en el complejo III. Los complejos I y III transfieren cuatro protones cada uno a través de la membrana por cada par de electrones. En el complejo IV, por cada par de electrones se bombean dos protones a través de la membrana y otros dos protones se combinan con el $O_2$ para formar $H_2O$ en la matriz. Así, en cada uno de estos tres complejos, se transporta fuera de la matriz mitocondrial el equivalente de cuatro protones por cada par de electrones. Esta transferencia de protones desde la matriz al espacio intermembrana desempeña el papel fundamental de convertir la energía derivada de las reacciones de oxidación/reducción del transporte de electrones en la energía potencial almacenada en un gradiente de protones.

Debido a que los protones son partículas cargadas eléctricamente, la energía potencial almacenada en el gradiente de protones es de naturaleza tanto eléctrica como química. El componente eléctrico corresponde a la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna, siendo la matriz de la mitocondria negativa y el espacio intermembrana positivo. La energía libre correspondiente viene dada por la ecuación

$$\Delta G = -F\Delta V$$

donde $F$ es la constante de Faraday y $\Delta V$ es el potencial de membrana. La energía libre adicional que corresponde a la diferencia en la concentración de protones a través de la membrana, viene dada por la ecuación:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

donde $[H^+]_i$ y $[H^+]_o$ se refieren a la concentración de protones dentro y fuera de la mitocondria, respectivamente.

En las células metabólicamente activas, los protones son bombeados fuera de la matriz de tal manera que el gradiente de protones a través de la membrana interna corresponde aproximadamente a una unidad de pH, o a una concentración de protones en el interior de la mitocondria diez veces menor (Fig. 10.10). Por lo tanto, el pH de la matriz mitocondrial es aproximadamente 8, comparado con el pH neutro (aproximadamente 7) del citosol y del espacio intermembrana. Este gradiente también genera un potencial eléctrico de aproximadamente 0,14 V a través de la membrana, siendo la matriz negativa. Tanto el gradiente



# Experimento clave

## Teoría quimiosmótica

**Acoplamiento de la fosforilación a la transferencia de electrones e hidrógeno mediante un mecanismo de tipo quimiosmótico**

Peter Mitchell

University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland

*Nature, 1961, Volume 191, págs. 144-148*

### Contexto

En los años 50 ya se había establecido claramente que en la fosforilación oxidativa intervenía la transferencia secuencial de electrones a través de una serie de transportadores hasta el oxígeno molecular. Pero permanecía siendo un misterio cómo se convertía en ATP la energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones. Lo más obvio era pensar que el ADP se convertía en ATP mediante la transferencia directa de grupos fosfato ricos en energía desde algún otro intermediario, como se sabía que ocurría durante la glicólisis. Así, se postuló que se producían intermediarios ricos en energía como consecuencia de las reacciones de transferencia de electrones, y que estos intermediarios posteriormente dirigían la síntesis de ATP mediante la transferencia del grupo fosfato.

La búsqueda de estos intermediarios ricos en energía se convirtió en uno de los objetivos fundamentales de la investigación durante los años 50 y 60. Pero a pesar de muchas primicias falsas, no se encontraron tales intermediarios. Además, había varios aspectos de la fosforilación oxidativa que eran difíciles de encajar con la hipótesis ortodoxa de que la síntesis de ATP estaba dirigida simplemente por la transferencia de un grupo fosfato. Concretamente, la fosforilación estaba estrechamente asociada a las membranas y se inhibía por diversos compuestos que alteraban la estructura de la membrana.

Estas consideraciones llevaron a Peter Mitchell a proponer un mecanismo fundamentalmente diferente de acoplamiento energético, en el que la síntesis de ATP estaba dirigida por un gradiente electroquímico a través de una membrana en lugar de por los intermediarios ricos en energía buscados por otros investigadores.

### Experimentos

La propuesta fundamental de la hipótesis quimiosmótica era que el «intermediario» que acoplaba el transporte de electrones a la síntesis de ATP era un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Mitchell postuló que tal gradiente estaba producido por el transporte de electrones, y que el flujo retrógrado de los protones a través de la membrana en la dirección energéticamente favorable se acoplaba a la síntesis de ATP (véase el gráfico).

La hipótesis del acoplamiento quimiosmótico explicaba claramente la falta de éxito en la identificación de un intermediario químico rico en energía,

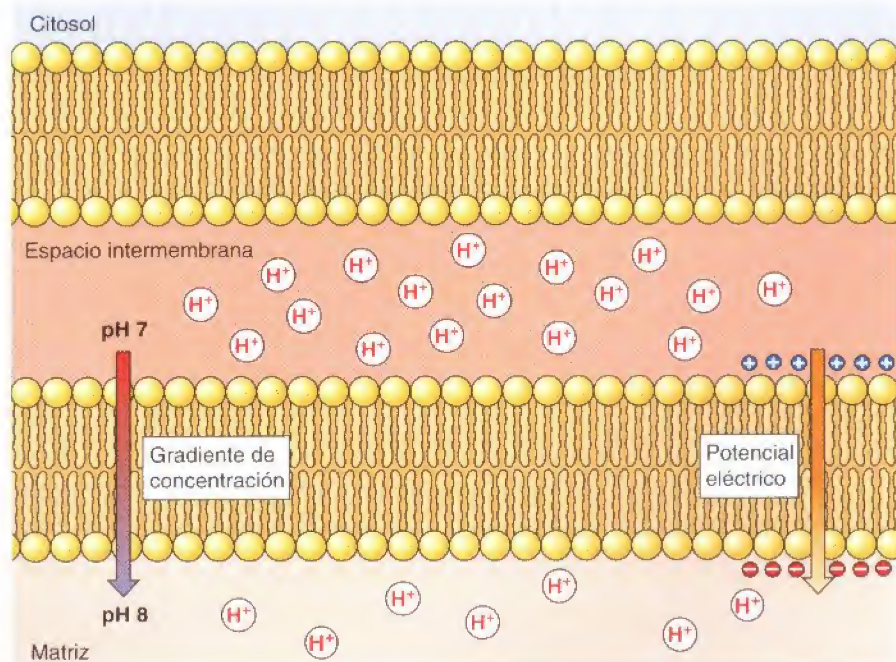
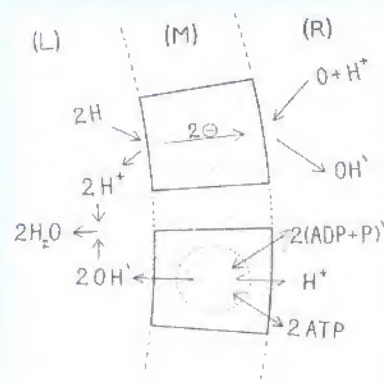



*Figura 10.10*
**Naturaleza electroquímica del gradiente de protones.** Debido a que los protones están cargados positivamente, el gradiente de protones que se establece a través de la membrana mitocondrial interna tiene un componente tanto químico como eléctrico. El componente químico es el gradiente de la concentración de protones, o de pH, que se corresponde con una concentración de protones aproximadamente diez veces superior en el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna (una diferencia de una unidad de pH). Además, hay un potencial eléctrico a través de la membrana, debido al incremento neto de la carga positiva en el lado citoplásmico.

### *Teoría quimiosmótica* (continuación)




Representación de Mitchell del acoplamiento quimiosmótico entre un sistema de transporte de electrones (en la parte superior) y un sistema generador de ATP (en la parte inferior) en una membrana (M) que delimita una fase acuosa L en un medio acuoso R.

así como el hecho de que se necesitaran las membranas intactas para la síntesis de ATP. Es más, fue un concepto radical que se enfrentó al dogma bioquímico de la época. En uno de los últimos párrafos del artículo de 1961, Mitchell asumió una visión filosófica de su propuesta revolucionaria:

*En las ciencias exactas, causa y efecto no son más que acontecimientos secuenciales.*

*Actualmente los bioquímicos aceptan la idea de que el metabolismo es la causa del transporte de membrana. La tesis subyacente a la hipótesis formulada aquí es que si los procesos que llamamos metabolismo y transporte representan acontecimientos en una secuencia, el metabolismo no sólo puede ser la causa del transporte sino que también el transporte puede ser la causa del metabolismo.*

#### Impacto

La hipótesis de Mitchell fue acogida con escepticismo y fue objeto de un agrio debate durante más de una década. Sin embargo, la gran cantidad de evidencias que apoyaban esta hipótesis, obtenidas por Mitchell y sus colaboradores así como por otros investigadores, finalmente condujeron a la aceptación general de la hipótesis quimiosmótica —conocida a partir de entonces como teoría quimiosmótica. Ahora es aceptada no sólo como la base para la generación de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, sino también para el transporte dependiente de energía de diversas moléculas a través de las membranas celulares.

El trabajo de Mitchell fue reconocido con el Premio Nobel en 1978. La conferencia que pronunció en esa ocasión comenzaba de la siguiente manera:



Peter Mitchell

*Aunque me hubiera gustado que el fundamento quimiosmótico del metabolismo vectorial y de la transferencia de energía biológica llegara a ser algun día generalmente aceptado, hubiera sido presuntuoso por mi parte esperar que eso ocurriera. ¿No fue Max Planck quien comentó que una idea científica nueva no triunfa porque convence a sus oponentes, sino porque sus oponentes se acaban muriendo? El hecho de que lo que empezó llamándose la hipótesis quimiosmótica haya sido ahora proclamado como la teoría quimiosmótica ... me ha sorprendido y me ha encantado, particularmente porque aquéllos que fueron anteriormente mis oponentes más competentes aún están en la etapa más importante de sus vidas científicas.*

de pH como el potencial eléctrico dirigen el flujo de protones desde el citosol de vuelta a la matriz, por lo que su combinación supone un **gradiente electroquímico** a través de la membrana mitocondrial interna, con una $\Delta G$ correspondiente de alrededor de −5 kcal/mol por protón.

Debido a que la bicapa fosfolipídica es impermeable a los iones, los protones sólo pueden atravesar la membrana a través de un canal de proteínas. Esta restricción permite aprovechar la energía del gradiente electroquímico y que sea convertida en ATP, mediante la acción del quinto complejo que interviene en la fosforilación oxidativa, el complejo V, o **ATP sintetasa** (véase Fig. 10.8). La ATP sintetasa está constituida por dos componentes estructuralmente diferentes, $F_0$ y $F_1$, que están unidos por un tallo estrecho (Fig. 10.11). La porción $F_0$ atraviesa la membrana interna y proporciona un canal a través del cual los protones fluyen de vuelta desde el espacio intermembrana a la matriz. El retorno energéticamente favorable de los protones a la matriz está acoplado con la síntesis de ATP mediante la subunidad $F_1$, que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP e iones fosfato ($P_i$). Estudios estructurales detallados han establecido el mecanismo de acción de la ATP sintetasa, que implica el acoplamiento mecánico entre las subu-

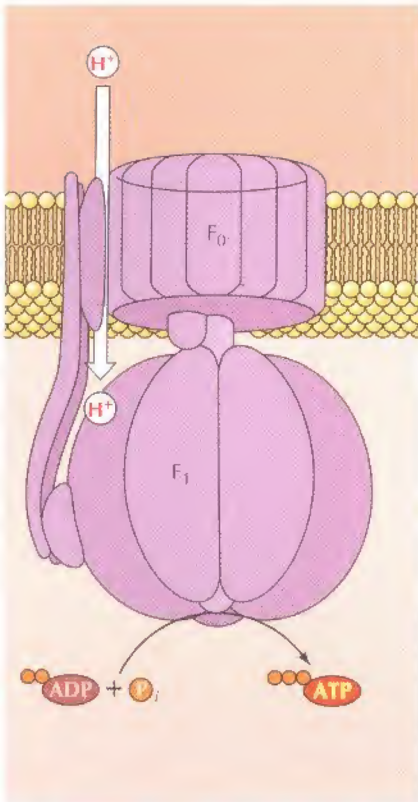



*Figura 10.11*
**Estructura de la ATP sintetasa.** La ATP sintetasa mitocondrial (complejo V) está constituida por dos subunidades, $F_0$ y $F_1$, que están unidas por un tallo estrecho. $F_0$ atraviesa la bicapa lipídica, formando un canal a través del cual los protones pueden atravesar la membrana. $F_1$ aprovecha la energía libre derivada del flujo de protones a favor del gradiente electroquímico, catalizando la síntesis de ATP.

nidades $F_0$ y $F_1$. Concretamente, el flujo de protones a través de $F_0$ determina la rotación de F, que actúa como un motor de rotación que dirige la síntesis de ATP.

Parece que se requiere el flujo de vuelta a través de la membrana de cuatro protones a través de $F_0$ para dirigir la síntesis de una molécula de ATP por $F_1$, lo que concuerda con que cada una de las transferencias de protones en los complejos I, III y IV, contribuye con la suficiente energía libre al gradiente de protones como para dirigir la síntesis de una molécula de ATP. De esta manera, la oxidación de una molécula de NADH da lugar a la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la oxidación de $FADH_2$, que entra en la cadena de transporte de electrones en el complejo II, genera sólo dos moléculas de ATP.

## *Transporte de metabolitos a través de la membrana interna*

Además de dirigir la síntesis de ATP, la energía potencial almacenada en el gradiente electroquímico dirige el transporte de moléculas pequeñas dentro y fuera de la mitocondria. Por ejemplo, el ATP sintetizado en las mitocondrias tiene que ser exportado al citosol, mientras que el ADP y el $P_i$, tienen que ser importados desde el citoplasma para que continúe la síntesis de ATP. El gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones proporciona la energía requerida para el transporte de estas moléculas y de otros metabolitos que se necesitan en las mitocondrias (Fig. 10.12).

El transporte de ATP y ADP a través de la membrana interna está mediado por una proteína integral de membrana, el transportador de nucleótidos de adenina, que transporta una molécula de ADP al interior de la mitocondria a cambio de una molécula de ATP transferida desde la mitocondria al citosol. Debido a que el ATP tiene una carga negativa mayor que el ADP (−4 en comparación con −3), este intercambio está dirigido por el componente eléctrico del gradiente electroquímico. Puesto que el gradiente de protones establece una carga positiva en el lado citosólico de la membrana, el intercambio de ATP por ADP es energéticamente favorable.

Además de ADP, la síntesis de ATP en la mitocondria también requiere iones fosfato ($P_i$), por lo que también debe importarse $P_i$ desde el citoplasma. Esto lo realiza otra proteína transportadora de membrana, que importa fosfato ($H_2PO_4^-$) y exporta iones hidroxilo ($OH^-$). Este intercambio es eléctricamente neutro porque tanto los iones fosfato como los iones hidroxilo tienen una carga de −1. Sin embargo, el intercambio está dirigido por el gradiente de la concentración de protones; el pH más elevado en el interior de las mitocondrias se corresponde con una mayor concentración de iones hidroxilo, lo que favorece su translocación al lado citosólico de la membrana.

La energía del gradiente electroquímico se utiliza de forma similar para dirigir el transporte de otros metabolitos al interior de las mitocondrias. Por ejemplo, el transporte de piruvato desde el citoplasma (donde se produce por la glicólisis) al interior de la mitocondria está mediado por un transportador que intercambia piruvato por iones hidroxilo. Otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico son capaces de ir y venir entre las mitocondrias y el citosol mediante mecanismos de intercambio similares.

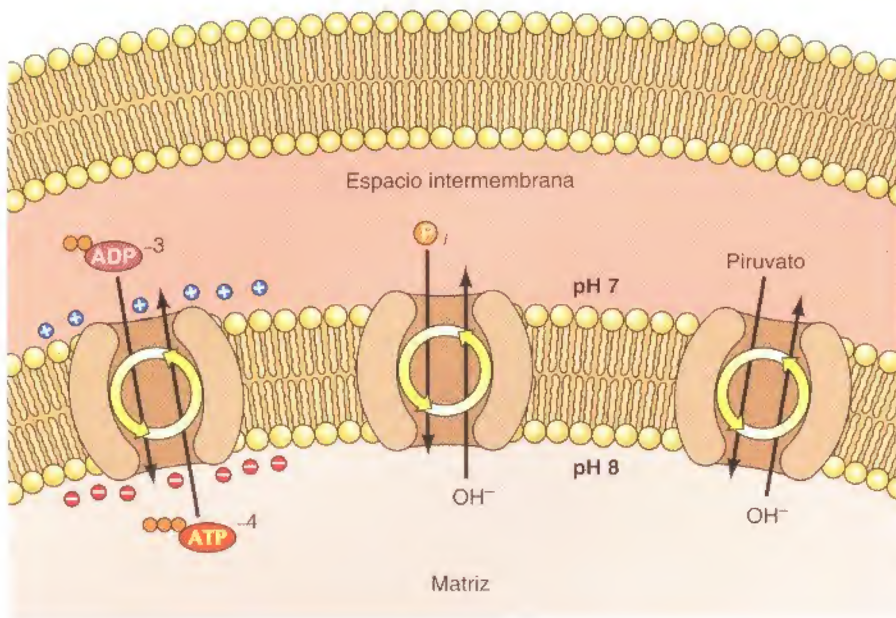



*Figura 10.12*
**Transporte de metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial.** El transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana interna mitocondrial está mediado por proteínas transportadoras que atraviesan la membrana y está dirigido por el gradiente electroquímico. Por ejemplo, el ATP es exportado desde las mitocondrias al citosol mediante un transportador que lo intercambia por ADP. El componente eléctrico del gradiente electroquímico dirige este intercambio: el ATP tiene una mayor carga negativa (–4) que el ADP (–3), por lo que el ATP es exportado desde la matriz mitocondrial al citosol mientras que el ADP es importado a la mitocondria. Por el contrario, el transporte de fosfato ($P_i$) y de piruvato está acoplado a un intercambio de iones hidroxilo ($OH^-$); en este caso el componente de pH del gradiente electroquímico dirige la exportación de iones hidroxilo, acoplada al transporte de $P_i$ y piruvato al interior de las mitocondrias.

## Cloroplastos y otros plástidos

Los **cloroplastos**, los orgánulos responsables de la fotosíntesis, son similares a las mitocondrias en muchos aspectos. Tanto los cloroplastos como las mitocondrias tienen como función generar energía metabólica, evolucionaron mediante endosimbiosis, contienen su propio sistema genético, y se replican por división. Sin embargo, los cloroplastos son más grandes y más complejos que las mitocondrias, y desempeñan varias funciones críticas además de generar ATP. Los cloroplastos son responsables de la conversión fotosintética de $CO_2$ en carbohidratos. Además, los cloroplastos sintetizan aminoácidos, ácidos grasos, y los componentes lipídicos de sus propias membranas. En los cloropastos también tiene lugar la reducción de nitrito ($NO_2^-$) a amoniaco ($NH_3$), una etapa esencial en la incorporación de nitrógeno a los compuestos orgánicos. Es más, los cloroplastos son sólo uno de los diferentes tipos de orgánulos relacionados (plástidos) que desempeñan diversos papeles en las células vegetales.

### *Estructura y función de los cloroplastos*

Los cloroplastos de las plantas son orgánulos grandes (5 a 10 $\mu$m de longitud) que, como las mitocondrias, están delimitados por una doble membrana denominada la envuelta del cloroplasto (Fig. 10.3). Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos tienen un tercer sistema de membranas interno, denominado la membrana del tilacoide. La **membrana del tilacoide** forma una red de discos aplanados denominados tilacoides, que suelen estar organizados en apilamientos denominados *grana*. Debido a esta estructura de membrana triple, la organización interna de los cloroplastos es más compleja que la de las mitocondrias. Concretamente, sus tres membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos diferentes: (1) el espacio intermembrana entre las dos membranas de la envoltura del cloroplasto; (2) el **estroma**, que se dispone dentro de la envuelta pero por fuera de la membrana del tilacoide; y (3) la luz del tilacoide.

A pesar de su mayor complejidad, las membranas de los cloroplastos tienen similitudes funcionales claras con las de las mitocondrias —como era de esperar, dado el papel de ambos orgánulos en la generación quimiosmótica de ATP—.

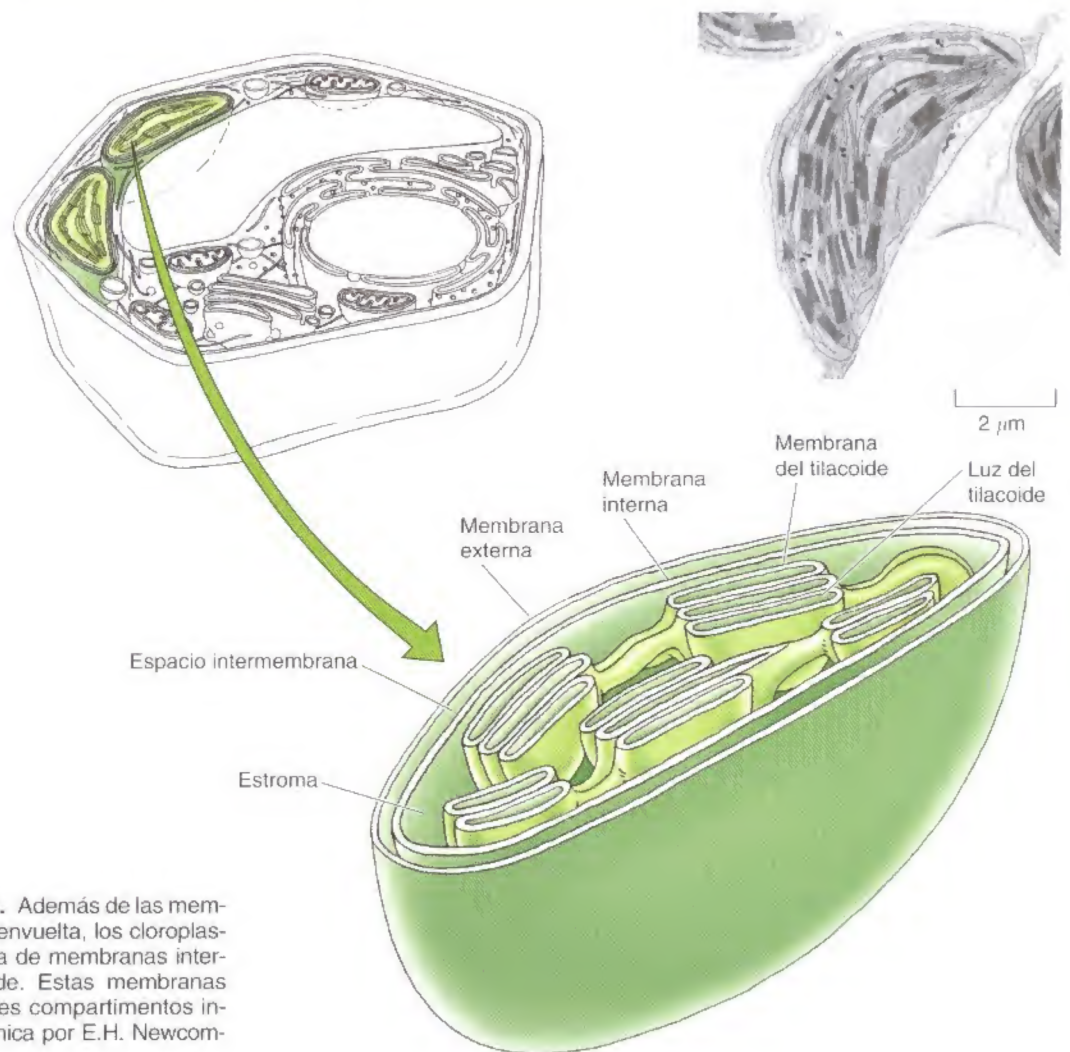



*Figura 10.13*
**Estructura de un cloroplasto.** Además de las membranas interna y externa de la envuelta, los cloroplastos contienen un tercer sistema de membranas internas: la membrana del tilacoide. Estas membranas dividen a los cloroplastos en tres compartimentos internos. (Microfotografía electrónica por E.H. Newcombe/Biological Photo Service.)

La membrana externa de la envuelta del cloroplasto, como la de la mitocondria, contiene porinas y por tanto es permeable a las moléculas pequeñas. Por el contrario, la membrana interna es impermeable a iones y a metabolitos, que sólo podrán entrar en los cloroplastos a través de transportadores específicos de membrana. Estas propiedades de las membranas interna y externa de la envuelta del cloroplasto son similares a las de las membranas interna y externa de las mitocondrias: en ambos casos la membrana interna restringe el paso de moléculas entre el citosol y el interior del orgánulo. El estroma del cloroplasto también equivale funcionalmente a la matriz mitocondrial: contiene el sistema genético del cloroplasto y diversas enzimas metabólicas, incluyendo las responsables de la conversión crítica de $CO_2$ en carbohidratos durante la fotosíntesis.

La principal diferencia entre los cloroplastos y las mitocondrias, tanto en términos de estructura como de función, es la membrana del tilacoide. Esta membrana tiene una importancia fundamental en los cloroplastos, donde realiza el papel de la membrana mitocondrial interna en el transporte de electrones y en la generación quimiosmótica de ATP (Fig. 10.14). La membrana interna de la envuelta del cloroplasto (que no está plegada en crestas) no participa en la fotosíntesis. En su lugar, el sistema de transporte de electrones del cloroplasto se localiza en la membrana del tilacoide, y los protones son bombeados a través de esta membrana desde el estroma hacia la luz del tilacoide. El gradiente elec-

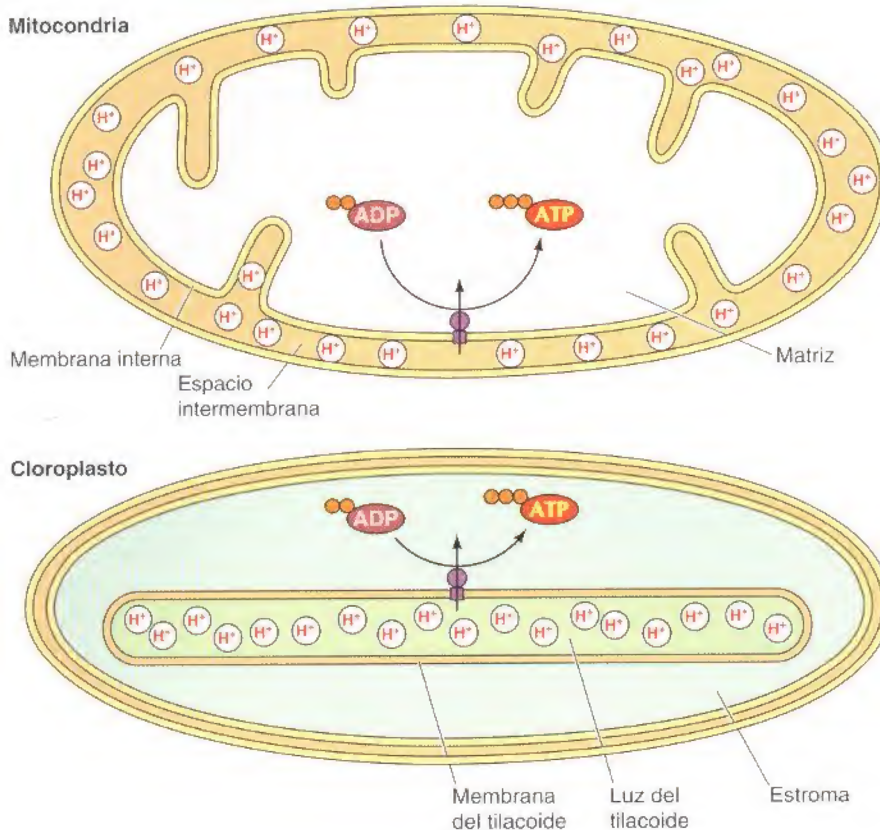



*Figura 10.14*
**Generación quimiosmótica de ATP en los cloroplastos y en las mitocondrias.** En las mitocondrias, el transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna, que se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en la matriz. En los cloroplastos, el gradiente de protones se genera a través de la membrana del tilacoide y se utiliza para dirigir la síntesis de ATP en el estroma.

troquímico resultante dirige la síntesis de ATP a medida que los protones retornan hacia el estroma. Por lo tanto, en cuanto a su papel en la generación de energía metabólica, la membrana del tilacoide de los cloroplastos equivale a la membrana interna de las mitocondrias.

## *Genoma del cloroplasto*

Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos contienen su propio sistema genético, lo que refleja su origen evolutivo a partir de bacterias fotosintéticas. El genoma de los cloroplastos se parece al de las mitocondrias en que está constituido por moléculas de ADN circular presentes en múltiples copias en cada orgánulo. Sin embargo, el genoma de los cloroplastos es más grande y más complejo que el de las mitocondrias, oscilando entre 120 y 160 kb y con un contenido aproximado de 150 genes.

Se ha secuenciado el genoma de los cloroplastos de varias plantas, lo que ha permitido identificar muchos de los genes presentes en el ADN de este orgánulo. Estos genes codifican tanto ARNs como proteínas que intervienen en la expresión génica, así como varias proteínas implicadas en la fotosíntesis (Tabla 10.2). Tanto los ARNs ribosómicos como los de transferencia utilizados para la traducción de los ARNm del cloroplasto son codificados por el genoma del orgánulo. Estos incluyen cuatro ARNr (23S, 16S, 5S, y 4,5S) y 30 especies de ARNt. A diferencia de lo que ocurría con el menor número de ARNt codificados por el genoma mitocondrial, los ARNt del cloroplasto son suficientes para que se traduzcan todos los codones del ARNm según el código genético universal. Además de estos componentes de ARN del sistema de traducción, el genoma del cloroplasto codifica alrededor de 20 proteínas ribosómicas, que representan aproximadamente un tercio de las proteínas de los ribosomas del cloroplasto. Algunas subunidades de la ARN polimerasa también son codificadas por los clo-

**TABLA 10.2.** Genes codificados por el ADN del cloroplasto

| Función | Número de genes |
|---|---|
| **Genes para el aparato genético** | |
| ARNr (23S,16S,5S, 4,5S) | 4 |
| ARNt | 30 |
| Proteínas ribosómicas | 21 |
| Subunidades de la ARN polimerasa | 4 |
| **Genes para la fotosíntesis** | |
| Fotosistema I | 5 |
| Fotosistema II | 12 |
| Complejo del citocromo *bf* | 4 |
| ATP sintetasa | 6 |
| Ribulosa bifosfato carboxilasa | 1 |

Los análisis de la secuencia indican que el genoma de los cloroplastos contiene otros 30 genes además de los enumerados aquí. Algunos de estos codifican proteínas implicadas en la respiración, pero la mayoría permanecen sin ser identificados.

roplastos, aunque otros factores y subunidades adicionales de la ARN polimerasa necesarios para la expresión genética del cloroplasto se codifican en el núcleo.

El genoma del cloroplasto también codifica aproximadamente 30 proteínas que intervienen en la fotosíntesis, incluyendo componentes de los fotosistemas I y II, componentes del complejo del citocromo *bf*, y componentes de la ATP sintetasa. Además, una de las subunidades de la ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco) está codificada por el ADN del cloroplasto. Rubisco es la enzima crítica que cataliza la adición de $CO_2$ a la ribulosa-1,5-bifosfato durante el ciclo de Calvin (véase Fig. 2.39). No sólo es el principal componente de las proteínas del estroma del cloroplasto, sino que también se considera que es la proteína más abundante de la Tierra, por lo que resulta notable que una de sus subunidades esté codificada por el genoma del cloroplasto.

## *Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto*

Aunque los cloroplastos codifican más proteínas propias que las mitocondrias, alrededor de 3.500 o el 95 % de las proteínas del cloroplasto las codifican los genes nucleares. Como ocurre en las mitocondrias, estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y después pasan al interior del cloroplasto como cadenas polipeptídicas completas. A continuación han de distribuirse a su localización apropiada en el cloroplasto —una tarea más complicada incluso que la distribución de las proteínas en las mitocondrias, ya que los cloroplastos contienen tres membranas separadas que los divide en tres compartimentos internos distintos.

Las proteínas son dirigidas para entrar en los cloroplastos mediante unas secuencias N-terminales de 30 a 100 aminoácidos denominadas **péptidos de tránsito**, que dirigen el transporte de las proteínas a través de las dos membranas de la envoltura del cloroplasto, y que después son eliminadas mediante escisión proteolítica (Fig. 10.15). Un **complejo guía** reconoce inicialmente a los péptidos de tránsito y los dirige al complejo de translocación del miembro externo del cloroplasto (el **complejo Toc**), donde se unen al receptor Toc159. A diferencia de las presecuencias para la internalización mitocondrial, los péptidos de tránsito no están cargados positivamente y la membrana interna del cloroplasto no posee un fuerte potencial eléctrico. La internalización de cloroplastos requiere moléculas Hsp70 para mantener a la pre-proteína en su estado sin plegar. Además, las moléculas Hsp70 están unidas al complejo Toc donde dirigen la internalización de proteínas mediante la hidrólisis de ATP. Al menos una proteína Toc, Toc34, une GTP, y la hidrólisis de GTP puede proporcionar una fuente adicional de energía para la translocación.

Una vez que se han transportado las pre-proteínas a través del complejo Toc, son transferidas al complejo de translocación de la membrana interna (el

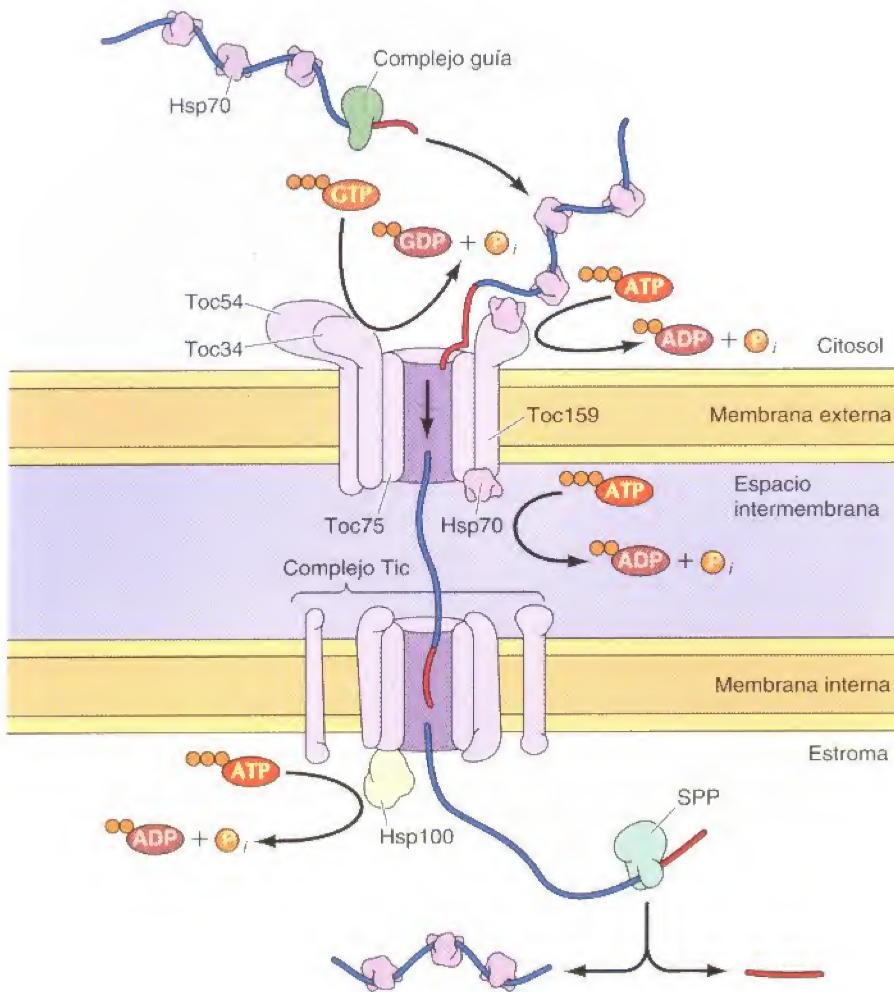



*Figura 10.15*
**Internalización de proteínas al estroma del cloroplasto.** Las proteínas con péptidos de tránsito N-terminales son reconocidas por un complejo guía que las dirige al complejo Toc, en la membrana externa del cloroplasto. El péptido de tránsito se une en primer lugar a Toc159, que se asocia con Hsp70, antes de pasar al poro de internalización Toc75. El paso a través de la membrana externa también requiere la hidrólisis de ATP por Hsp70 presente en el espacio intermembrana, y posiblemente la hidrólisis de GTP por parte de Toc34. Una vez que ha atravesado la membrana externa del cloroplasto, el péptido de tránsito pasa al complejo Tic en la membrana interna. La pre-proteína es arrastrada a través del complejo Tic por la acción de Hsp100. En el estroma, el péptido de tránsito es eliminado por la peptidasa procesadora estromal (SPP) del cloroplasto y la proteína interacciona con Hsp70.

**complejo Tic**) y transportadas a través de la membrana interna al estroma. Al igual que los complejos Toc, Tom y Tim, Tic es un complejo multiproteína con uno o más canales proteicos. Sin embargo, se conoce poco sobre las proteínas específicas, quizás porque hay más de un tipo de complejo Tic. Una chaperona de la familia Hsp100 (otra familia de chaperonas además de las familias Hsp60, Hsp70 y Hsp90 estudiadas en el Capítulo 7) está asociada con el lado estromal del complejo Tic. Esta Hsp100 del cloroplasto actúa para arrastrar a la pre-proteína a través de la membrana interna. En el estroma, el péptido de tránsito es escindido por una **peptidasa procesadora estromal (SPP: *stromal processing peptidase*)**, y la proteína se asocia con las chaperonas Hsp70 estromales. Al igual que en la matriz mitocondrial, algunas proteínas que permanecen en el estroma completan su plegamiento en el interior de una chaperonina Hsp60.

Se conoce poco sobre cómo las proteínas se dirigen a las membranas externa o interna del cloroplasto. Al igual que en la mitocondria, algunas proteínas se insertan directamente en la membrana externa de la envuelta del cloroplasto. Del mismo modo, algunas proteínas destinadas a la membrana del tilacoide se insertan directamente en la membrana después de plegarse en el estroma.

Las proteínas que deben incorporarse en el lumen del tilacoide se transportan a su destino en dos pasos. En primer lugar son internalizadas en el estroma,

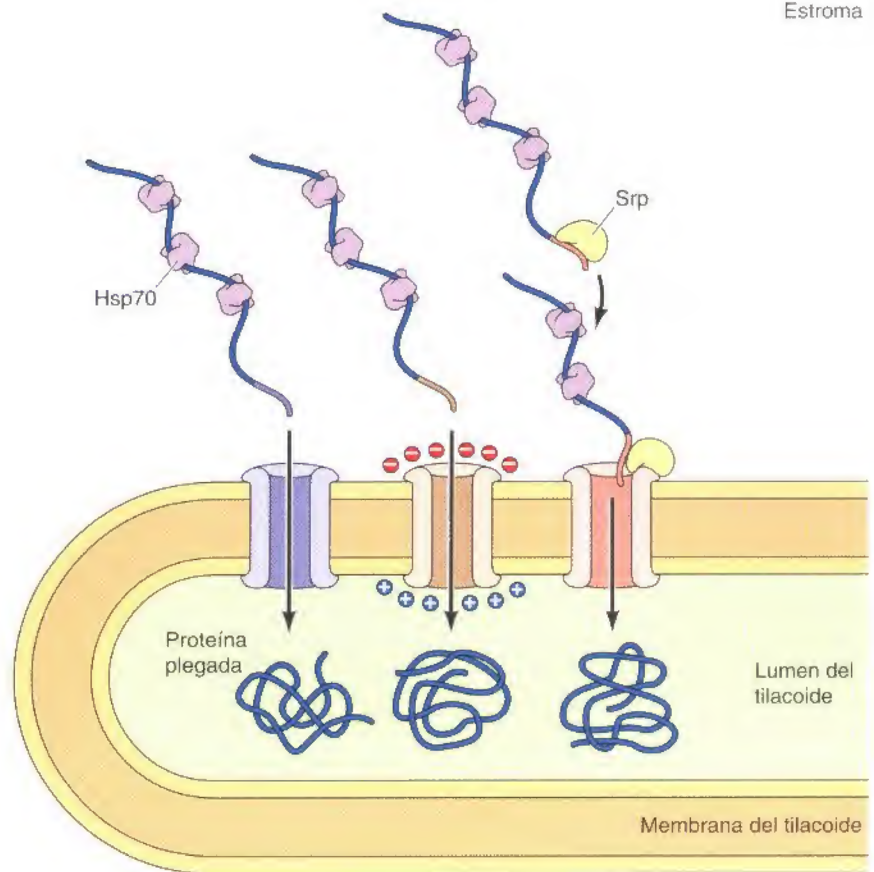



*Figura 10.16*
**Internalización de proteínas en el lumen del tilacoide.** Existen tres tipos diferentes de complejos de membrana que tansfieren proteínas desde el estroma al lumen del tilacoide. Las proteínas sin plegar se asocian con la Hsp70 estromal y son dirigidas a cada complejo por señales N-terminales específicas. Un complejo no requiere un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, mientras que un segundo complejo sí. Un tercer complejo reconoce una partícula de reconocimiento de la señal estromal, que se une a algunas proteínas que se sintetizaron en el citosol, además de proteínas que fueron traducidas en cromosomas del cloroplasto.

como se ha descrito previamente, y a continuación dirigidas para su translocación a través de la membrana del tilacoide por una segunda secuencia señal. Las proteínas se translocan al lumen del tilacoide a través de tres complejos de translocación diferentes (Fig. 10.16). Un complejo de translocación es independiente del gradiente de protones existente a través de la membrana tilacoidea, mientras que otro requiere un gradiente de protones. Las proteínas se dirigen al tercer complejo de translocación por una partícula de reconocimiento de la señal estromal, que también reconoce proteínas codificadas por el genoma del cloroplasto y traducidas sobre los ribosomas del cloroplasto.

## *Otros plástidos*

Los cloroplastos son sólo uno de los miembros, aunque el más importante, de una familia más amplia de orgánulos vegetales denominados **plástidos**. Todos los plástidos contienen el mismo genoma que los cloroplastos, pero se diferencian tanto en la estructura como en la función. Los cloroplastos están especializados para la fotosíntesis y son únicos al contener el sistema interno de membranas del tilacoide. Otros plástidos, que intervienen en diversos aspectos del metabolismo de la célula vegetal, están delimitados por las dos membranas de la envuelta del plástido pero carecen de las membranas del tilacoide y de otros componentes del aparato fotosintético.

Los diferentes tipos de plástidos se suelen clasificar en función de los tipos de pigmentos que contienen. Los cloroplastos se denominan así porque contienen clorofila. Los **cromoplastos** (Fig. 10.17A) no tienen clorofila pero contienen

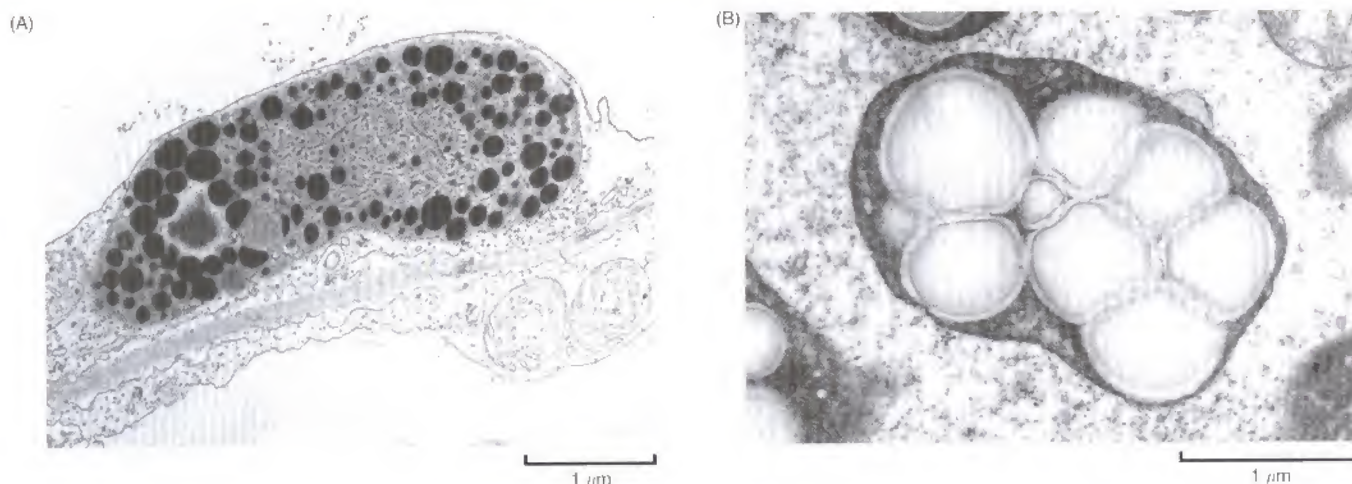


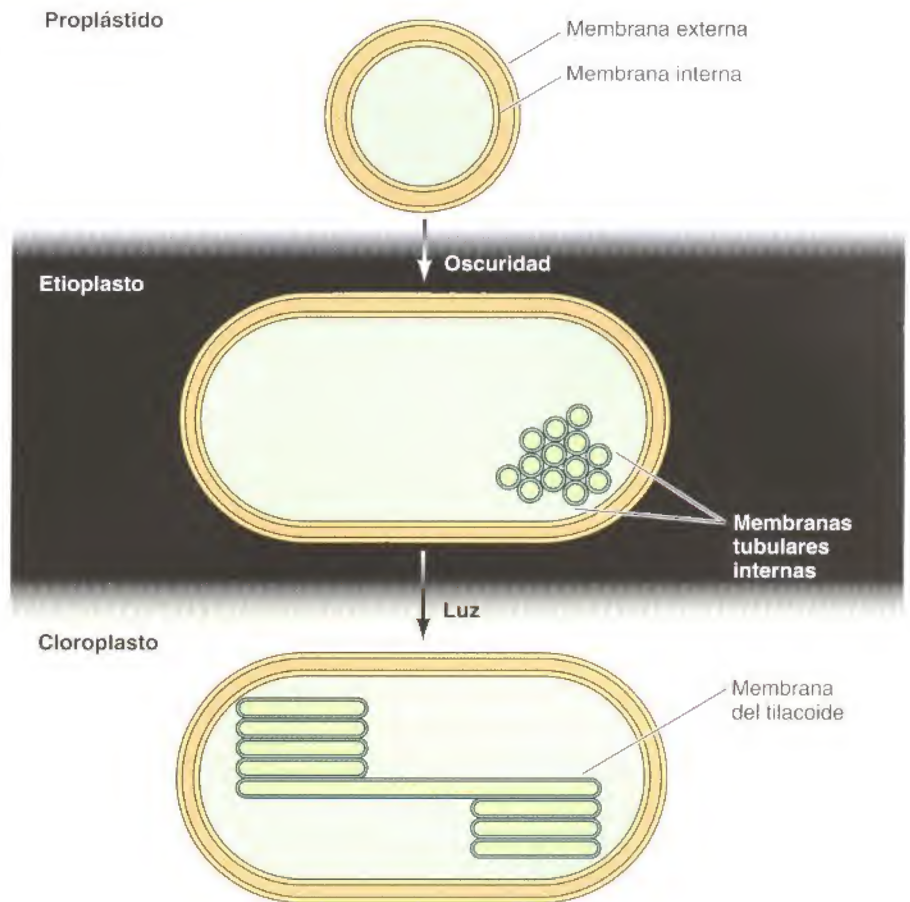

*Figura 10.17*
**Microfotografías electrónicas de cromoplastos y amiloplastos.** (A) Los cromoplastos contienen gotitas de lípidos donde se almacenan carotenos. (B) Los amiloplastos contienen gránulos grandes de almidón.

carotenos; son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de algunas flores y frutas, aunque no está clara su función concreta en el metabolismo celular. Los **leucoplastos** son plástidos no pigmentados que almacenan diversas fuentes de energía en los tejidos no fotosintéticos. Los **amiloplastos** (Fig. 10.17B) y los **elaioplastos** son ejemplos de leucoplastos que almacenan almidón y lípidos, respectivamente.

Todos los plástidos, incluidos los cloroplastos, proceden de los **proplástidos**, orgánulos pequeños (0,5 μm a 1 μm de diámetro) e indiferenciados, presentes en las células en división de las raíces y brotes de las plantas. Los proplástidos posteriormente dan lugar a los diversos tipos de plástidos maduros, en función de las necesidades de las células diferenciadas. Además, los plástidos maduros son capaces de cambiar de un tipo a otro. Por ejemplo, los cromoplastos se desarrollan a partir de los cloroplastos durante la maduración de la fruta (p. ej., los tomates). Durante este proceso se descomponen la clorofila y la membrana del tilacoide, mientras que se sintetizan nuevos tipos de carotenos.

Una característica interesante de los plástidos es que su desarrollo está controlado por señales ambientales y por programas intrínsecos de diferenciación celular. Por ejemplo, en las células fotosintéticas de las hojas, los proplástidos dan lugar a los cloroplastos (Fig. 10.18). Durante este proceso la membrana del tilacoide se origina por gemación de vesículas a partir de la membrana interna de la envoltura del plástido, y se sintetizan y ensamblan los diferentes componentes del aparato fotosintético. Sin embargo, los cloroplastos sólo se desarrollan en presencia de luz. Si las plantas se mantienen en la oscuridad, el desarrollo de los proplástidos en las hojas se detiene en un estado intermedio (denominado **etioplasto**), en el que se ha formado una estructura semicristalina de membranas internas tubulares pero no se ha sintetizado clorofila (Fig. 10.19). Si las plantas que han crecido en la oscuridad se exponen posteriormente a la luz, los etioplastos continúan su desarrollo hasta cloroplastos. Hay que destacar que este doble control del desarrollo de los plástidos implica la expresión coordinada de genes en los genomas del plástido y nuclear. Los mecanismos responsables de esta expresión génica coordinada se desconocen por completo, y su esclarecimiento representa un desafío en la biología molecular de las plantas.

*Figura 10.18*
**Desarrollo de los cloroplastos.** Los cloroplastos se desarrollan a partir de los proplástidos en las células fotosintéticas de las hojas. Los proplástidos contienen sólo las membranas interna y externa de la envoltura; la membrana del tilacoide se forma por gemación de vesículas a partir de la membrana interna durante el desarrollo del cloroplasto. Si la planta se mantiene en la oscuridad, el desarrollo de los cloroplastos se detiene en un estadio intermedio (etioplastos). Los etioplastos no tienen clorofila y contienen unas estructuras semicristalinas de membranas tubulares. En presencia de luz, continúan su desarrollo hacia cloroplastos.




## Fotosíntesis

Durante la fotosíntesis se obtiene la energía de la luz solar y se utiliza para dirigir la síntesis de glucosa a partir de $CO_2$ y $H_2O$. Al convertir la energía de la luz solar en una forma utilizable de energía potencial química, la fotosíntesis es la fuente fundamental de energía metabólica para todos los sistemas biológicos. La fotosíntesis se realiza en dos fases distintas. En las reacciones de la fase lumínica, la energía de la luz solar dirige la síntesis de ATP y NADPH, acoplada a la formación de $O_2$ a partir del $H_2O$. En las reacciones de la fase oscura, denominadas así porque no requieren luz solar, el ATP y el NADPH producido en la fase lumínica dirigen la síntesis de glucosa. En las células eucariotas, tanto la fase lumínica como la fase oscura de la fotosíntesis tienen lugar en los cloroplastos —las reacciones de la fase lumínica en la membrana tilacoidal y las reacciones de la fase oscura en el estroma. En esta sección se tratan las reacciones de la fase lumínica de la fotosíntesis, que están relacionadas con la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Las reacciones de la fase oscura se trataron en detalle en el Capítulo 2.

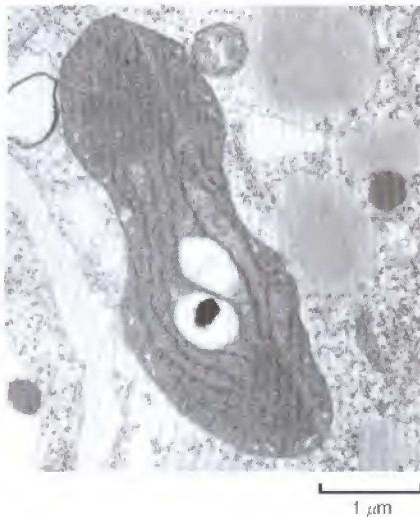



*Figura 10.19*
**Microfotografía electrónica de un etioplasto.** (John N. A. Lott/Biological Photo Service.)

### *Flujo de electrones a través de los fotosistemas I y II*

La luz solar es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, siendo las **clorofilas** los pigmentos más abundantes en las plantas. La absorción de la luz excita un electrón a un estado energético más elevado, convirtiendo así la energía de la luz solar en energía química potencial. Los pigmentos fotosintéticos están organizados en **fotocentros** en la membrana del tilacoide, cada uno de los cuales contiene cientos de moléculas de pigmento (Fig. 10.20). Las numerosas molé-

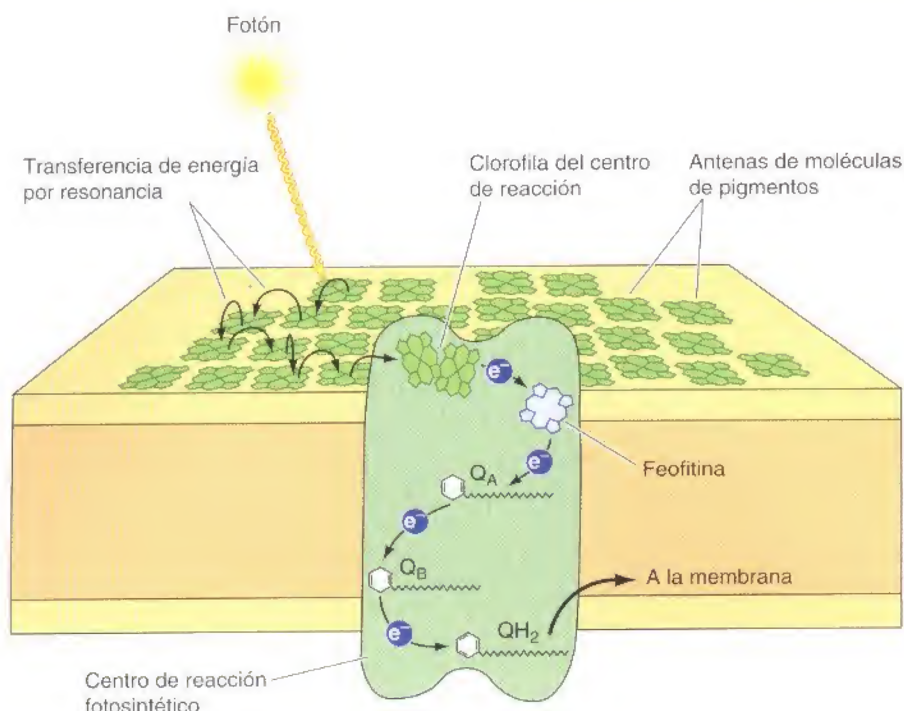



*Figura 10.20*
**Organización de un fotocentro.** Cada fotocentro está constituido por cientos de antenas de moléculas de pigmentos, que absorben los fotones y transfieren energía a la clorofila del centro de reacción. La clorofila del centro de reacción transfiere a continuación su electrón excitado a un aceptor en la cadena de transporte de electrones. Aquí se muestra el centro de reacción del fotosistema II, en el que los electrones se transfieren desde la clorofila del centro de reacción a la feofitina y después a las quinonas ($Q_A$, $Q_B$, y $QH_2$).

culas de pigmento en cada fotocentro actúan como antenas, absorbiendo la luz y transfiriendo la energía de sus electrones excitados a una molécula de clorofila que sirve como centro de reacción. La clorofila del centro de reacción transfiere a continuación su electrón de alta energía a una molécula aceptora de una cadena de transporte de electrones. Los electrones de alta energía se transfieren entonces a través de una serie de transportadores de membrana, acoplados a la síntesis de ATP y de NADPH.

El centro de reacción fotosintético mejor caracterizado es el de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, cuya estructura fue determinada por Johann Deisenhofer Hartmut Michel, Robert Huber, y sus colaboradores en 1985 (Fig. 10.21). El centro de reacción está constituido por tres polipéptidos transmembrana, unidos a un citocromo de tipo *c* que se localiza en el lado externo de la membrana. La energía procedente de la luz solar es capturada por un par de moléculas de clorofila conocidas como el par especial. A continuación los electrones se transfieren desde el par especial a otro par de clorofilas y desde allí a otros grupos prostéticos (feofitinas y quinonas). Desde allí los electrones se transfieren a un complejo citocromo *bc*, donde el transporte de electrones se acopla a la generación de un gradiente de protones. A continuación los electrones son transferidos al citocromo del centro de reacción y finalmente retornan al par especial de clorofilas. Por lo tanto, el centro de reacción convierte la energía de la luz solar en electrones de alta energía, cuya energía potencial se convierte en un gradiente de protones por el complejo del citocromo *bc*.

En los vegetales, las proteínas que intervienen en la fase lumínica de la fotosíntesis se organizan en cinco complejos en la membrana del tilacoide (Fig. 10.22). Dos de estos complejos son fotosistemas (**fotosistemas I y II**), en los

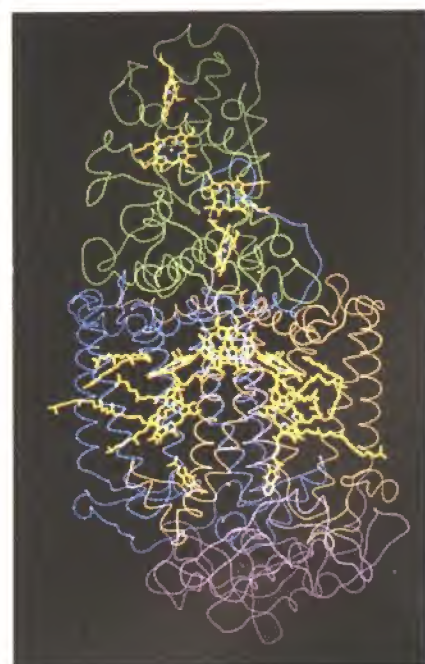


*Figura 10.21*
**Estructura de un centro de reacción fotosintético.** El centro de reacción de *R. viridis* está constituido por tres proteínas transmembrana (púrpura, azul y beige) y un citocromo de tipo *c* (verde). Las clorofilas y otros grupos prostéticos están coloreados en amarillo (Cortesía de Johann Deisenhofer, University of Texas Medical Center and The Nobel Foundation, 1989).

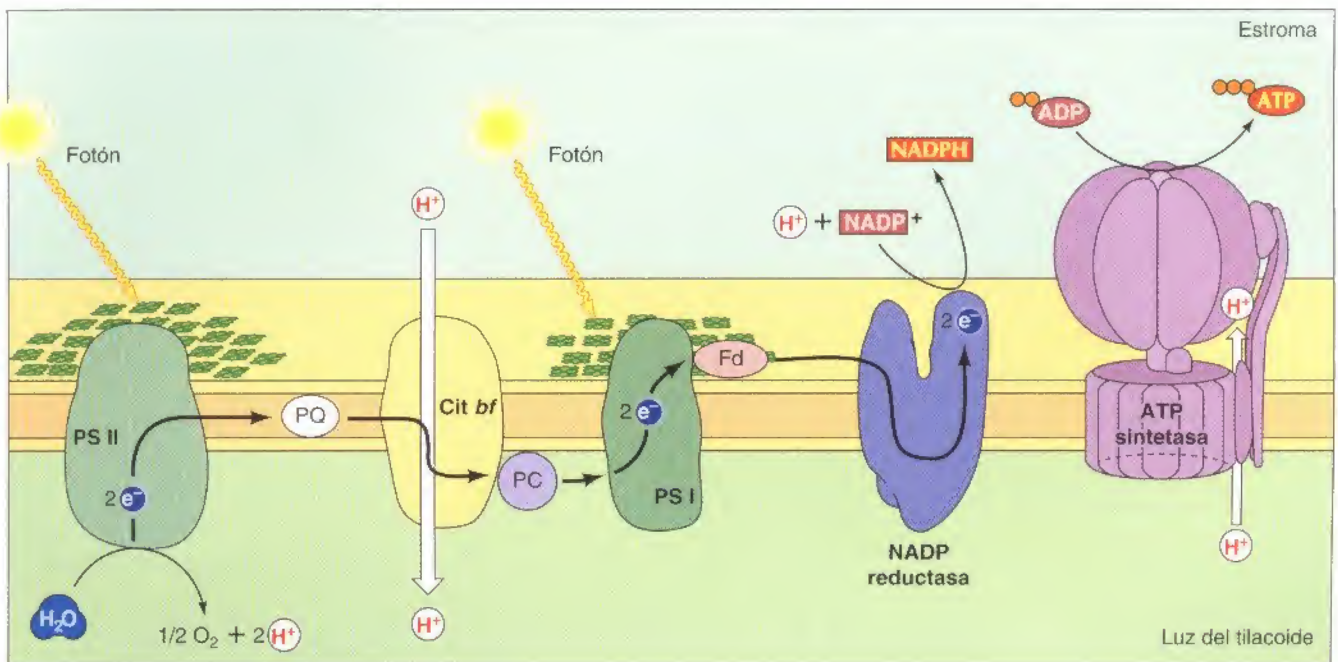



*Figura 10.22*
**Transporte de electrones y síntesis de ATP durante la fotosíntesis.** En el transporte de electrones y en la síntesis de ATP y NADPH intervienen cinco complejos proteicos en la membrana del tilacoide. Los fotones son absorbidos por complejos de moléculas de pigmento asociadas con los fotosistemas I y II (PS I y PS II). En el fotosistema II, la energía derivada de la absorción de fotones se utiliza para escindir una molécula de agua en la luz del tilacoide. A continuación los electrones son transportados por la plastoquinona (PQ) al complejo citocromo *bf*, donde pasan a un estado energético inferior y se bombean protones al interior de la luz del tilacoide. Los electrones son transferidos después al fotosistema I mediante la plastocianina (PC). En el fotosistema I, la energía derivada de la absorción de la luz vuelve a generar electrones de alta energía, que son transferidos a la ferredoxina (Fd) y se utilizan para reducir el $NADP^+$ a NADPH en el estroma. La ATP sintetasa utiliza después la energía almacenada en el gradiente de protones para convertir el ADP en ATP.

que la luz se absorbe y se transfiere a las clorofilas del centro de reacción. Los electrones de alta energía se transfieren a través de una serie de transportadores tanto en los fotosistemas como en un tercer complejo de proteínas, el **complejo citocromo *bf***. Al igual que sucede en las mitocondrias, la transferencia de electrones está acoplada a la transferencia de protones a la luz del tilacoide, estableciéndose así un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La energía almacenada en este gradiente de protones se obtiene posteriormente por un cuarto complejo de proteínas de la membrana del tilacoide, la ATP sintetasa, que (al igual que la enzima mitocondrial) acopla un flujo retrógrado de protones, a través de la membrana, a la síntesis de ATP.

Una diferencia importante entre el transporte de electrones en los cloroplastos y en las mitocondrias es que la energía derivada de la luz solar durante la fotosíntesis no sólo es convertida en ATP sino que también se utiliza para generar el NADPH requerido para convertir el $CO_2$ en carbohidratos. Esto se consigue utilizando dos fotosistemas diferentes en la fase lumínica de la fotosíntesis, uno para generar ATP y el otro para generar NADPH. Los electrones se transfieren de forma secuencial entre los dos fotosistemas, interviniendo el fotosistema I para generar NADPH y el fotosistema II para generar ATP.

El flujo de electrones se inicia en el fotosistema II, que es homólogo al centro de reacción fotosintético de *R. viridis* ya descrito. Sin embargo, en el fotosistema II la energía derivada de la absorción de los fotones se utiliza para romper moléculas de agua en oxígeno molecular y protones (véase Fig. 10.22). Esta reacción tiene lugar en la luz del tilacoide, por lo que la liberación de protones a partir del $H_2O$ determina un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. Los electrones de alta energía derivados de este proceso se transfieren a través de una serie de transportadores a la plastoquinona, un transportador liposoluble similar a la coenzima Q (ubiquinona) de las mitocondrias. La plastoquinona transporta los electrones desde el fotosistema II al complejo citocromo *bf*, en el que los electrones son transferidos a la plastocianina y se bombean más protones al interior de la luz del tilacoide. De esta manera, el transporte de electrones a través del fotosistema II está acoplado a la generación de un gradiente de protones, que dirige la síntesis quimiosmótica de ATP.

Desde el fotosistema II, los electrones son transportados por la plastocianina (una proteína periférica de membrana) hasta el fotosistema I, donde la absorción de otros fotones vuelve a generar electrones de alta energía. El fotosistema I, sin embargo, no actúa como una bomba de protones, sino que utiliza estos electrones de alta energía para reducir el $NADP^+$ a NADPH. La clorofila del centro de reacción del fotosistema I transfiere sus electrones excitados a través de una serie de transportadores hasta la ferredoxina, una pequeña proteína de la membrana del tilacoide que da al estroma. La enzima **NADP reductasa** transfiere después los electrones desde la ferredoxina hasta el $NADP^+$, generando NADPH. Por lo tanto, el paso de los electrones a través de los fotosistemas I y II genera ATP y NADPH, que son utilizados por las enzimas del ciclo de Calvin en el estroma del cloroplasto para convertir $CO_2$ en carbohidratos (véase Fig. 2.39).

### *Flujo cíclico de electrones*

Una segunda ruta de transporte de electrones, denominada **flujo cíclico de electrones**, genera ATP sin la síntesis de NADPH, proporcionando de este modo ATP adicional para otros procesos metabólicos. En el flujo cíclico de electrones, la energía de la luz obtenida en el fotosistema I se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH (Fig. 10.23). Los electrones ricos en energía en lugar de ser transferidos al $NADP^+$, son transferidos desde el fotosistema I al complejo citocromo *bf*. La transferencia de electrones a través del complejo citocromo *bf* se acopla, al igual que en el fotosistema II, a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide. La plastocianina devuelve posteriormente estos electrones al fotosistema I en un estado energético más bajo, completando un ciclo de transporte de electrones en el que la energía lumínica obtenida en el fotosistema I se utiliza para bom-

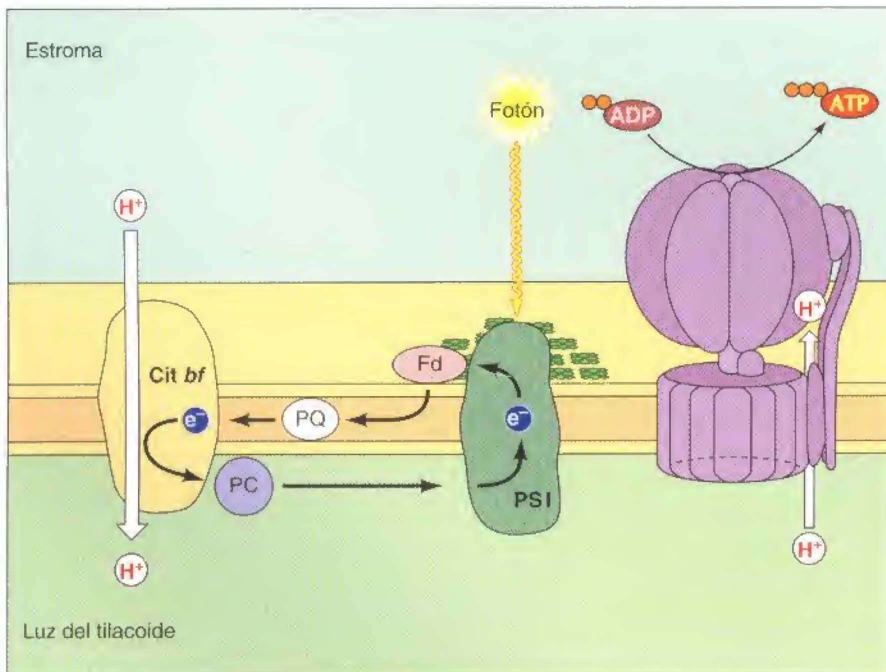



*Figura 10.23*
**Ruta del flujo cíclico de electrones.** La energía luminosa absorbida en el fotosistema I (PS I) se utiliza para la síntesis de ATP en lugar de para la síntesis de NADPH. Los electrones de alta energía generados por la absorción de fotones se transfieren al complejo citocromo *bf* en lugar de al $NADP^+$. En el complejo citocromo *bf*, los electrones pasan a un estado energético menor y se bombean protones al interior de la luz del tilacoide. Los electrones son devueltos a continuación al fotosistema I mediante la plastocianina (PC).

bear protones en el complejo citocromo *bf*. Por lo tanto, la transferencia de electrones desde el fotosistema I puede generar ATP o NADPH, dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula.

### *Síntesis de ATP*

La ATP sintetasa de la membrana del tilacoide es similar a la enzima mitocondrial. Sin embargo, la energía almacenada en el gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, a diferencia de lo que ocurre en la membrana mitocondrial interna, es de naturaleza química casi en su totalidad. Esto es debido a que la membrana del tilacoide, aunque es impermeable a los protones, difiere de la membrana mitocondrial interna en que es permeable a otros iones, concretamente al $Mg^{2+}$ y al $Cl^-$. El paso libre de estos iones neutraliza el componente de voltaje del gradiente de protones, por lo que la energía derivada de la fotosíntesis se conserva principalmente como una diferencia en la concentración de protones (pH) a través de la membrana del tilacoide. Sin embargo, puesto que la luz del tilacoide es un compartimento cerrado, esta diferencia en la concentración de protones puede ser bastante grande, con una variación entre el estroma y la luz del tilacoide de más de tres unidades de pH. Dada la magnitud de este diferencial de pH, la energía libre total almacenada a través de la membrana del tilacoide es similar a la almacenada a través de la membrana mitocondrial interna.

Por cada par de electrones transportados, en el fotosistema II se transfieren dos protones a través de la membrana del tilacoide, y de dos a cuatro protones en el complejo citocromo *bf*. Puesto que se necesitan cuatro protones para dirigir la síntesis de una molécula de ATP, el paso de cada par de electrones a través de los fotosistemas I y II mediante el flujo no cíclico de electrones rinde entre 1 y 1,5 moléculas de ATP. El flujo cíclico de electrones tiene un rendimiento inferior, entre 0,5 y 1 moléculas de ATP por cada par de electrones.

## Peroxisomas

Los **peroxisomas** son orgánulos pequeños, rodeados por una membrana (Fig. 10.24) que contienen enzimas implicadas en diversas reacciones metabólicas, incluyendo varios aspectos del metabolismo energético. Aunque los peroxisomas son morfológicamente similares a los lisosomas, a semejanza de las mitocondrias y de los cloroplastos están constituidos por proteínas que se sintetizan en ribosomas libres y después son importadas a los peroxisomas como cadenas polipeptídicas completas. Aunque los peroxisomas no contienen un genoma propio, se parecen a las mitocondrias y cloroplastos en que se replican

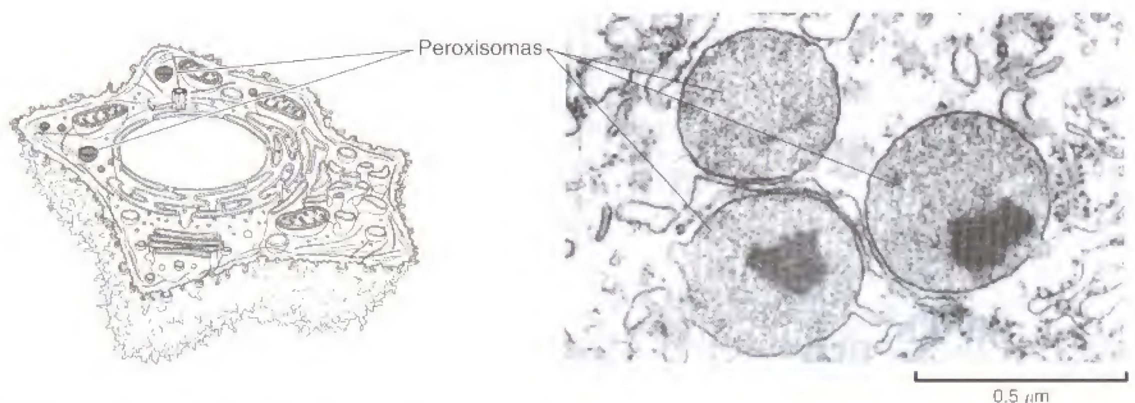



*Figura 10.24*
**Microfotografía electrónica de los peroxisomas.** Se muestran tres peroxisomas de hígado de rata. Dos contienen regiones densas, que son formaciones paracristalinas de la enzima urato oxidasa. (Don Fawcett/ Photo Researchers, Inc.)







o




*Figura 10.25*
**Oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas.** La oxidación de un ácido graso se acompaña de la producción de peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) a partir del oxígeno. El peróxido de hidrógeno se descompone por la acción de una catalasa, bien mediante la formación de agua u oxidando otro compuesto orgánico (designado $AH_2$).

por división. La mayoría de las células humanas contienen unos 500 peroxisomas.

## *Funciones de los peroxisomas*

Los peroxisomas contienen al menos 50 enzimas diferentes, que están implicadas en diversas rutas bioquímicas en diferentes tipos de células. Originalmente, los peroxisomas se definieron como orgánulos que llevaban a cabo reacciones oxidativas produciendo peróxido de hidrógeno. Debido a que el peróxido de hidrógeno es nocivo para la célula, los peroxisomas también contienen la enzima **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno bien convirtiéndolo en agua o utilizándolo para oxidar otro compuesto orgánico. Diversos sustratos se degradan mediante estas reacciones oxidativas en los peroxisomas, incluyendo el ácido úrico, aminoácidos y ácidos grasos. La oxidación de los ácidos grasos (Fig. 10.25) es un ejemplo especialmente importante ya que proporciona una fuente fundamental de energía metabólica. En las células animales los ácidos grasos se oxidan tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias, pero en las levaduras y en las plantas la oxidación de los ácidos grasos está restringida a los peroxisomas.

Además de proporcionar un compartimento para las reacciones de oxidación, los peroxisomas intervienen en la biosíntesis de lípidos. En las células animales el colesterol y el dolicol se sintetizan en los peroxisomas y en el RE. En el hígado, los peroxisomas también intervienen en la síntesis de los ácidos biliares, que derivan del colesterol. Además, los peroxisomas contienen enzimas necesarias para la síntesis de los **plasmalógenos** —una familia de fosfolípidos en los que una de las cadenas hidrocarbonadas está unida al glicerol mediante un enlace éter en lugar de por un enlace éster (Fig. 10.26). Los plasmalógenos son componentes importantes de la membrana en algunos tejidos, particularmente en el corazón y en el cerebro, aunque están ausentes en otros. Los peroxisomas realizan diferentes reacciones bioquímicas en distintos tejidos. Sin embargo, actualmente se desconoce si existen subpoblaciones de peroxisomas que se especializan en uno o un número limitado de procesos en el interior celular.

En las plantas los peroxisomas desempeñan dos papeles especialmente importantes. En primer lugar, los peroxisomas en las semillas son los responsables de convertir los ácidos grasos almacenados, en carbohidratos, aspecto que es crítico para proporcionar energía y materia prima para el desarrollo de la planta. Esto ocurre a través de una serie de reacciones denominadas el **ciclo**

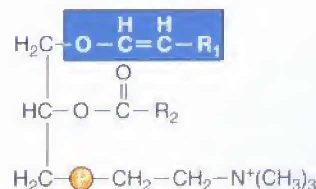



*Figura 10.26*
**Estructura de un plasmalógeno.** El plasmalógeno mostrado es semejante a la fosfatidilcolina. Sin embargo, una de las cadenas de ácido graso está unida al glicerol mediante un enlace éter, en lugar de por un enlace éster.

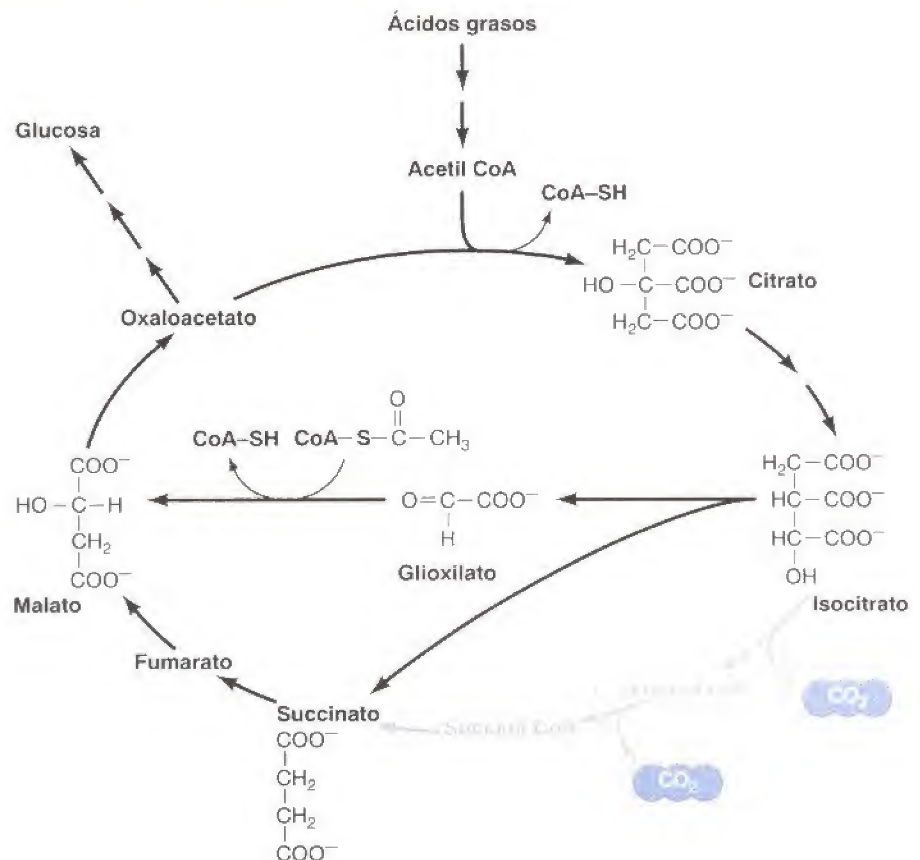



*Figura 10.27*
**Ciclo del glioxilato.** Las plantas son capaces de sintetizar carbohidratos a partir de los ácidos grasos a través del ciclo del glioxilato, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (véase Fig. 2.34). Como sucede en el ciclo del ácido cítrico, el acetil CoA se combina con oxaloacetato para formar citrato, que es convertido en isocitrato. Sin embargo, en lugar de ser degradado a $CO_2$ y $\alpha$-cetoglutarato, el isocitrato pasa a succinato y glioxilato. El glioxilato reacciona a continuación con otra molécula de acetil CoA para generar malato, que es convertido en oxaloacetato y utilizado para la síntesis de glucosa.

**del glioxilato**, que es una variante del ciclo del ácido cítrico (Fig. 10.27). Los peroxisomas en los que tiene lugar este ciclo a veces se denominan **glioxisomas**.

En segundo lugar, los peroxisomas de las hojas están implicados en la **fotorrespiración**, que sirve para metabolizar un producto derivado de la fotosíntesis (Fig. 10.28). En la fotosíntesis, el $CO_2$ es convertido en carbohidratos a través de una serie de reacciones denominadas el ciclo de Calvin (véase Fig. 2.39). El primer paso es la adición de $CO_2$ al azúcar de cinco carbonos ribulosa-1,5-bifosfato, que da lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (cada una de ellas con tres carbonos). Sin embargo, la enzima responsable (ribulosa bifosfato carboxilasa o rubisco) algunas veces cataliza la adición de $O_2$ en lugar de $CO_2$, produciendo una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato (dos carbonos). Esta es una reacción secundaria, y el fosfoglicolato no es un metabolito útil. Primero es convertido en glicolato y después transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina se transfiere a las mitocondrias, donde dos moléculas de glicina son convertidas en una molécula de serina, con la pérdida de $CO_2$ y $NH_3$. La serina es devuelta a continuación a los peroxisomas, donde es convertida en glicerato. Finalmente, el glicerato retorna a los cloroplastos, donde se reintroduce en el ciclo de Calvin. La

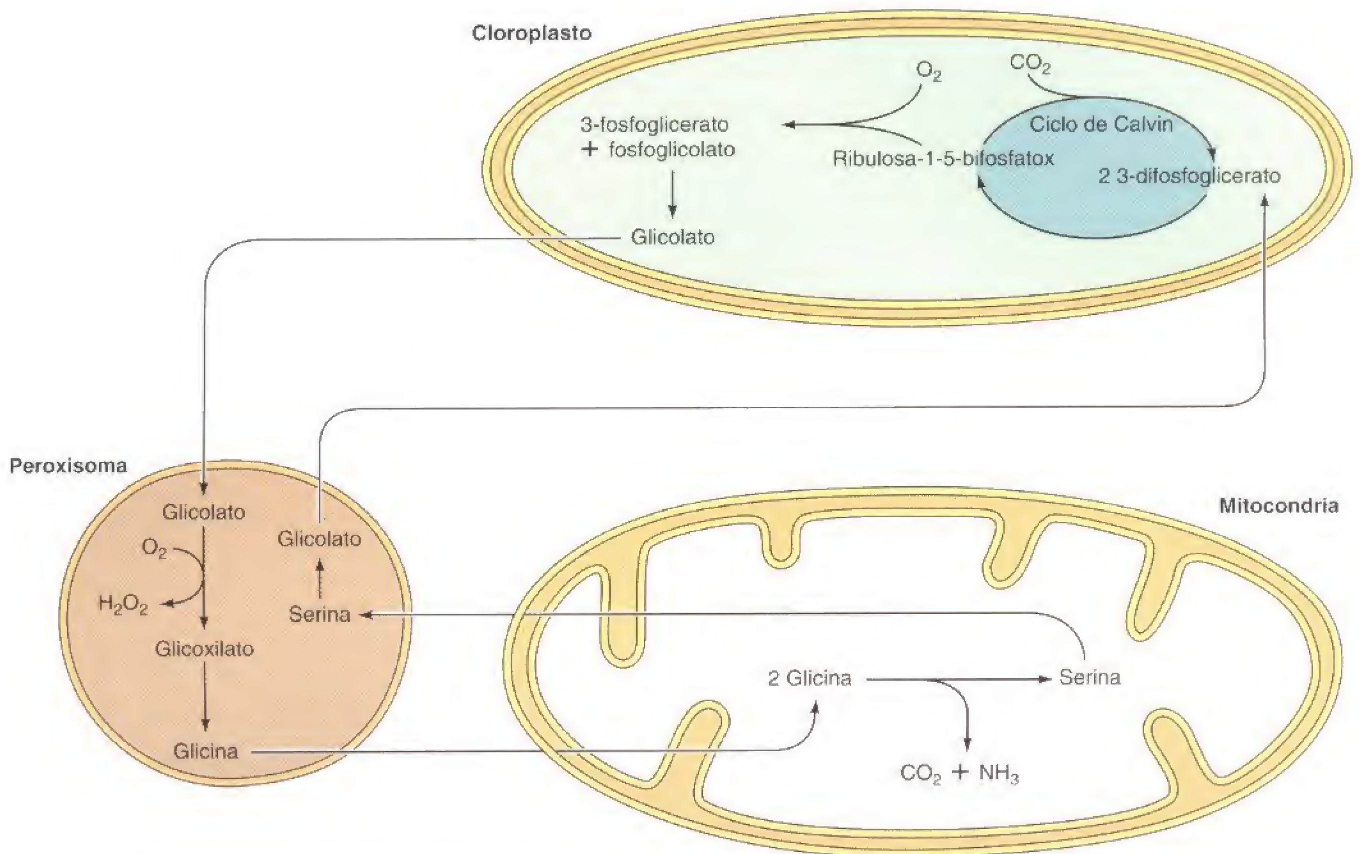



*Figura 10.28*
**Papel de los peroxisomas en la fotorrespiración.** Durante la fotosíntesis, el $CO_2$ es convertido en carbohidratos mediante el ciclo de Calvin, que se inicia con la adición de $CO_2$ al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1-5-bifosfato. Sin embargo, algunas veces, la enzima implicada cataliza la adición de $O_2$ en lugar de $CO_2$, dando lugar al compuesto de dos carbonos fosfoglicolato. El fosfoglicolato es convertido en glicolato, que posteriormente es transferido a los peroxisomas, donde se oxida y se convierte en glicina. La glicina a continuación es transferida a la mitocondria y se convierte en serina. La serina es devuelta a los peroxisomas y convertida en glicerato, que es devuelto a los cloroplastos.

fotorrespiración no parece que sea beneficiosa para la planta, ya que esencialmente es el proceso opuesto a la fotosíntesis —se consume $O_2$ y se libera $CO_2$ sin obtener nada de ATP—. Sin embargo, la utilización ocasional del $O_2$ en lugar del $CO_2$ parece que es una característica inherente de la rubisco, por lo que la fotorrespiración suele acompañar a la fotosíntesis. Por lo tanto, los peroxisomas desempeñan un papel importante al permitir que la mayor parte del carbono presente en el glicolato sea recuperado y utilizado.

## *Formación del peroxisoma*

Como ya se ha mencionado, la formación de los peroxisomas se parece mucho más a la de las mitocondrias y cloroplastos que a la del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas. Las proteínas destinadas a los peroxisomas se traducen en ribosomas citosólicos libres y después se transportan al interior de los peroxisomas como cadenas polipeptídicas completas (Fig. 10.29). Los fosfolípidos también se importan a los peroxisomas desde el RE, mediante proteínas de transferencia de fosfolípidos. La internalización de proteínas y fosfolípidos da lugar a que el peroxisoma crezca; y se formarán nuevos peroxisomas mediante la división de los viejos.

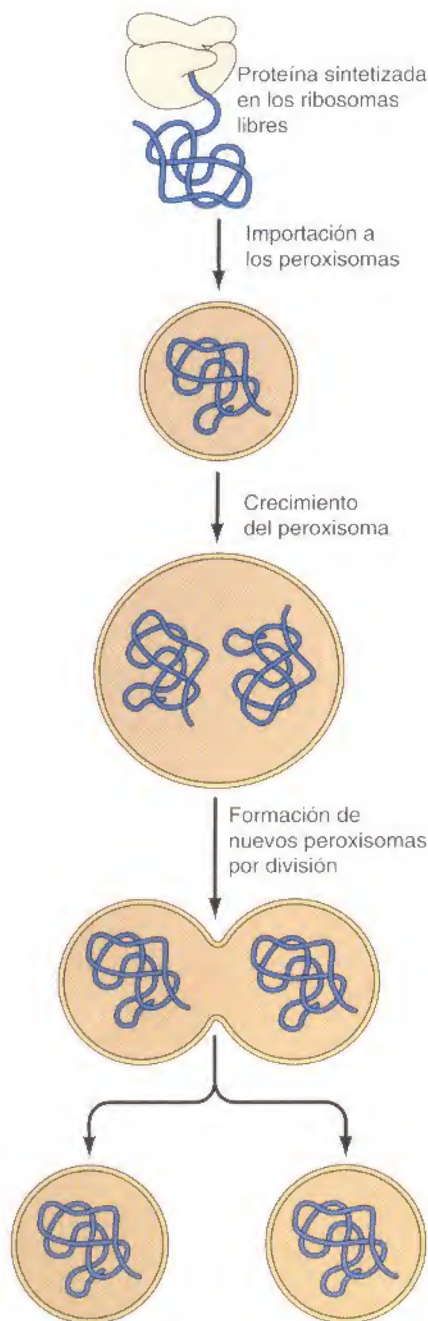



*Figura 10.29*
**Formación de peroxisomas.** Las proteínas destinadas a los peroxisomas se sintetizan en ribosomas libres y se importan en forma de cadenas polipeptídicas completas a peroxisomas preexistentes. Esto da lugar al crecimiento del peroxisoma y a la formación de nuevos peroxisomas a partir de la división de los antiguos.

Las proteínas se dirigen al interior de los peroxisomas al menos por dos vías, que se han conservado desde las levaduras hasta los humanos. La mayor parte de las proteínas están marcadas para dirigirse a los peroxisomas, por la secuencia de aminoácidos Ser-Lys-Leu en su extremo carboxilo terminal (señal 1 de dirección al peroxisoma, o PTS1). Otras proteínas se dirigen mediante una secuencia de nueve aminoácidos (PTS2) en su extremo amino terminal.

PTS1 y PTS2 son reconocidas por receptores diferentes y después se transfieren a un complejo de translocación que media su transporte a través de la membrana del peroxisoma. A diferencia de la translocación de cadenas polipeptídicas a través de las membranas del retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos, las señales de localización generalmente no se escinden durante el importe de proteínas en los peroxisomas. Se ha implicado a la Hsp70 citosólica en la internalización de proteínas en los peroxisomas, pero el papel de las chaperonas moleculares en los peroxisomas no está claro. El plegamiento de las proteínas de los peroxisomas se produce en el citosol en asociación con proteínas receptoras, y las proteínas pueden insertarse en los peroxisomas en conformaciones parcialmente plegadas, en lugar de como cadenas polipeptídicas extendidas.

Los peroxisomas sufren un complejo proceso de maduración, que implica la internalización de distintas clases de proteínas desde el citosol en diferentes momentos. Los receptores de la membrana del peroxisoma necesarios para dirigir las enzimas luminales deben ser internalizadas primero. Existe evidencia de que estos receptores parten del RE en una vesícula lipídica pre-peroxisomal. Además, el estudio de los receptores sugiere que el contenido enzimático, y por tanto las actividades metabólicas de los peroxisomas, varía a medida que maduran.

Hay que destacar que algunos componentes de las rutas de internalización de los peroxisomas se han identificado no sólo como mutantes en levaduras sino también como mutaciones asociadas con varias enfermedades humanas graves, relacionadas con alteraciones de los peroxisomas. En algunas de estas enfermedades sólo se produce la deficiencia de una única enzima peroxisómica. Sin embargo, en otras enfermedades ocasionadas por defectos en la función del peroxisoma, lo que ocurre es que varias enzimas del peroxisoma no entran en el orgánulo, localizándose en el citosol. Este último grupo de enfermedades se produce por deficiencias en las rutas del PTS1 y PTS2 responsables de la internalización de proteínas en los peroxisomas. El ejemplo típico es el síndrome de Zellweger, que es letal en los primeros diez años de vida. El síndrome de Zellweger puede producirse por mutaciones en, al menos, diez genes diferentes, que afectan a la internalización de proteínas en el peroxisoma, uno de los cuales se ha identificado como el gen que codifica el receptor para la señal directora PTS1.

## PALABRAS CLAVE

**mitocondrias, crestas, matriz, porina**

## RESUMEN

### MITOCONDRIAS

***Organización y función de las mitocondrias:*** Las mitocondrias, que desempeñan un papel crítico en la generación de la energía metabólica, están rodeadas por un sistema de doble membrana. La matriz contiene las enzimas del ciclo del ácido cítrico; la membrana interna contiene complejos pro-

teínicos implicados en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. A diferencia de la membrana interna, la membrana externa es completamente permeable a las moléculas pequeñas.

***Sistema genético de las mitocondrias:*** Las mitocondrias contienen su propio genoma, que codifica para el ARNr, ARNt y para algunas de las proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa.

**endosimbiosis**

***Internalización de proteínas y formación de las mitocondrias:*** La mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear. Estas proteínas son traducidas en ribosomas libres y entran en las mitocondrias como cadenas polipeptídicas completas. Las presecuencias cargadas positivamente dirigen las proteínas para que sean importadas a la matriz mitocondrial. Los fosfolípidos son transportados a las mitocondrias desde el retículo endoplásmico mediante proteínas transportadoras de fosfolípidos.

**presecuencia, complejo Tom, complejo Tim, peptidasa procesadora de la matriz (MPP), proteína de transferencia de fosfolípidos, cardiolipina**

## MECANISMO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

***Cadena de transporte de electrones:*** La mayor parte de la energía derivada del metabolismo oxidativo procede de la transferencia de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al $O_2$. Para poder disponer de esta energía, los electrones son transferidos a través de una serie de transportadores organizados en cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial interna.

**fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones, coenzima Q, ubiquinona, citocromo *c*, citocromo oxidasa**

***Acoplamiento quimiosmótico:*** Las reacciones productoras de energía del transporte de electrones están acopladas a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía potencial almacenada en este gradiente se obtiene mediante un quinto complejo proteínico, la ATP sintetasa, que acopla la síntesis de ATP al retorno, energéticamente favorable, de los protones a la matriz mitocondrial.

**acoplamiento quimiosmótico, gradiente electroquímico, ATP sintetasa**

***Transporte de metabolitos a través de la membrana interna:*** Además de dirigir la síntesis de ATP, la energía potencial almacenada en el gradiente de protones dirige el transporte de ATP, ADP y otros metabolitos al interior y exterior de las mitocondrias.

## CLOROPLASTOS Y OTROS PLÁSTIDOS

***Estructura y función de los cloroplastos:*** Los cloroplastos son orgánulos grandes responsables de la fotosíntesis y de otras actividades metabólicas. Como sucede con las mitocondrias, los cloroplastos están rodeados por una envuelta de doble membrana. Además los cloroplastos tienen una membrana tilacoidal interna, que es el lugar del transporte de electrones y de la generación quimiosmótica de ATP.

**cloroplasto, membrana del tilacoide, estroma**

***Genoma del cloroplasto:*** El genoma del cloroplasto contiene más de 100 genes, incluyendo genes que codifican ARNr, ARNt, algunas proteínas ribosómicas y algunas proteínas que intervienen en la fotosíntesis.

***Internalización y distribución de las proteínas del cloroplasto:*** La mayoría de las proteínas del cloroplasto son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol, y son marcadas para que se importen a los cloroplastos mediante péptidos de tránsito amino terminales. Las proteínas incorporadas en la luz del tilacoide, primero se importan al estroma del cloroplasto y después se marcan con una segunda secuencia señal hidrofóbica para su transporte a través de la membrana del tilacoide.

**péptido de tránsito, complejo guía, complejo Toc, complejo Tic, peptidasa procesadora estromal (SPP)**

**plástido, cromoplasto, leucoplasto, amiloplasto, elaioplasto, proplástido, etioplasto**

***Otros plástidos:*** El cloroplasto es sólo uno de los miembros de una familia de orgánulos relacionados, que contienen el mismo genoma. Otros plástidos sirven para almacenar fuentes de energía, como almidón y lípidos, e intervienen en otros aspectos del metabolismo de la planta.

## FOTOSÍNTESIS

**clorofila, fotocentro, fotosistema I, fotosistema II, complejo citocromo *bf*, NADP reductasa**

***Flujo de electrones a través de los fotosistemas I y II:*** Durante la fotosíntesis, se obtiene la energía procedente de la luz solar y se convierte en una forma utilizable de energía química potencial. La absorción de la luz por las clorofilas excita los electrones a un estado energético más elevado. Después, estos electrones de alta energía se transfieren a través de una serie de transportadores organizados en dos fotosistemas y en el complejo citocromo *bf*, en la membrana del tilacoide. El flujo secuencial de los electrones a través de ambos fotosistemas está acoplado a la síntesis de ATP en el fotosistema II y a la reducción de $NADP^+$ a NADPH en el fotosistema I. Tanto el ATP como el NADPH se utilizan para la síntesis de carbohidratos a partir de $CO_2$, que tiene lugar en el estroma del cloroplasto.

**flujo cíclico de electrones**

***Flujo cíclico de electrones:*** La ruta alternativa del flujo cíclico de electrones permite que la energía de la luz obtenida en el fotosistema I sea convertida en ATP, en lugar de en NADPH.

***Síntesis de ATP:*** La síntesis quimiosmótica de ATP está dirigida por un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide.

## PEROXISOMAS

**peroxisoma, catalasa, plasmalógeno, ciclo del glioxilato, glioxisoma, fotorrespiración**

***Funciones de los peroxisomas:*** Los peroxisomas son orgánulos pequeños, rodeados por una única membrana, que contienen enzimas que intervienen en diversas reacciones metabólicas, entre las que se incluyen la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo del glioxilato, y la fotorrespiración.

***Formación del peroxisoma:*** Las proteínas del peroxisoma son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol y se importan al peroxisoma en forma de cadenas polipeptídicas completas. Existen al menos dos tipos de señales que dirigen a las proteínas al interior de los peroxisomas, pero el mecanismo de la internalización de proteínas no se conoce bien.

# Preguntas

**1.** ¿Qué dos propiedades de la membrana mitocondrial interna le permiten tener una actividad metabólica especialmente elevada?

**2.** De acuerdo con reglas «*wobble*» estándar, la síntesis proteica citosólica puede tener lugar con un mínimo de 30 ARNt diferentes. ¿Cómo consiguen las mitocondrias humanas traducir ARNm en proteínas con sólo 22 especies de ARNt?

**3.** Asuma que se ha disipado el potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna, por lo que el gradiente electroquímico está compuesto únicamente por un gradiente de concentración de protones que corresponde a una unidad de pH. Calcule la energía libre almacenada en este gradiente. Para su cálculo, utilice $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/grado, $T = 298$ K (25° C), y tenga en cuenta que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.

**4.** ¿Qué papeles juegan las chaperonas moleculares en la internalización de proteínas en la mitocondria?

**5.** El citocromo $b_2$ es sintetizado en el citosol y posee una segunda secuencia señal hidrofóbica, después de la secuencia mitocondrial de carga positiva habitual. Sugiera una vía que le llevará a su destino final en el espacio intermembrana mitocondrial.

**6.** ¿Cuáles son los papeles de la coenzima Q y el citocromo c en la cadena de transporte electrónica?

**7.** La ATP sintasa consiste en dos complejos multisubunidad, $F_0$ y $F_1$. ¿Dónde se localiza cada uno en la mitocondria y en el cloroplasto y cuál es la función de cada uno de ellos?

**8.** ¿Por qué los péptidos de tránsito de las proteínas de los cloroplastos, a diferencia de las presecuencias de las proteínas mitocondriales, no están cargados positivamente?

9.¿Cuántos electrones de alta energía son necesarios para dirigir la síntesis de una molécula de glucosa durante la fotosíntesis, acoplada a la formación de seis moléculas de $O_2$? ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH genera el paso de estos electrones a través de los fotosistemas I y II?

10. ¿Qué fracción de los átomos de carbono convertidos en glicolato durante la fotorrespiración son recuperados por los peroxisomas?

11. ¿Cómo se dirigen las proteínas a los peroxisomas?

## Bibliografía

### *Mitocondrias*


Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140. [P]

Clayton, D. A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 453-478. [R]

Dietrich, A., J. H. Weil and L. Marechal-Drouard. 1992. Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 115-131. [R]

Gabriel, K., S. K. Buchanan and T. Lithgow. 2001. The alpha and the beta: Protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. *Trends Biochem. Sci.* 26: 36-40. [R]

Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481. [R]

Jensen, R. E. and C. D. Dunn. 2002. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: Role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 25-34. [R]

Lang, B. F., G. Burger, C. J. O'Kelly, R. Cedergren, G. B. Golding, C. Lemieux, D. Sankoff, M. Turmel and M. W. Gray. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387: 493-497. [P]

Luft, R. 1994. The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8731-8738. [R]

Michel, H. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12819-12824. [P]

Michikawa, Y., F. Mazzucchelli, N. Bresolin, G. Scarlato and G. Attardi. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286: 774-779. [P]

Neupert, W. and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 555-565. [R]

Peeters, N. and I. Small. 2001. Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 54-63. [R]

Pfanner, N. and A. Chacinska. 2002. The mitochondrial import machinery: Preprotein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 15-24. [R]

Pfanner, N. and A. Geissler. 2001. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 339-349. [R]

Pfanner, N. and N. Wiedemann. 2002. Mitochondrial protein import: Two membranes, three translocases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 400-411. [R]

Rapaport, D. 2002. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem. Sci.* 27: 191-197. [R]

Shadel, G. S. and D. A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 409-435. [R]

Stuart, R. 2002. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: The role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 79-87. [R]

Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488. [R]


### *Mecanismo de la fosforilación oxidativa*


Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069. [R]

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206: 1148-1159. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. London: Academic Press.

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39: 210-215. [R]

Rastogi, V. and M. E. Girvin. 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402: 263-268. [P]

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493. [R]

Tielens, A. G., C. Rotte, J. J. Van Hellemond and W. Martin 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27: 564-572. [R]

Yoshida M., E. Muneyuki and T. Hisabori. 2001. ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 669-677. [R]


### *Cloroplastos y otros plástidos*


Chen, X. and D. J. Schnell. 1999. Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 9: 222-227. [R]

Douce, R. and J. Joyard. 1990. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 173-216. [R]

Ellis, R. J. 1990. Molecular chaperones: The plant connection. *Science* 250: 954-959. [R]

Gruissem, W. 1989. Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170. [R]

Jackson-Constan, D., M. Akita and K. Keegstra. 2001. Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 102-113. [R]

Jarvis, P. and J. Soll. 2002. Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1590: 177-189. [R]

Rochaix, J. -D. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 1-28. [R]

Subramanian, A. R. 1993. Molecular genetics of chloroplast ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 177-180. [R]

Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149-168. [R]

van Dooren, G. G., S. D. Schwartzbach, T. Osafune and G. I. McFadden. 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 34-53. [R]


### *Fotosíntesis*


Arnon, D. I. 1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9: 258-262. [R]

Barber, J. and B. Andersson. 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370: 31-34. [R]

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268-271. [R]

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis*. *Nature* 318: 618-624. [P]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 1-23. [R]

Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621. [P]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press.

Rhee, K.-H., E. P. Morris, J. Barber and W. Kuhlbrandt. 1998. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283-286. [P]

Rogner, M., E. J. Boekema and J. Barber. 1996. How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 21: 44-49. [R]

Youvan, D. C. and B. L. Marrs. 1987. Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256(6): 42-48. [R]


### *Peroxisomas*


Gould, S. J. and C. S. Collins. 2002. Peroxisomal-protein import: Is it really that com-

plex? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 382-389. [R]

Tabak, H. F., I. Braakman and B. Distel. 1999. Peroxisomes: Simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol.* 9: 447-453. [R]

Titorenko, V. I. and R. A. Rachubinski. 2001. The life cycle of the peroxisome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 357-368. [R]

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157. [R]

Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197. [R]

# 11

# Citoesqueleto y movimiento celular



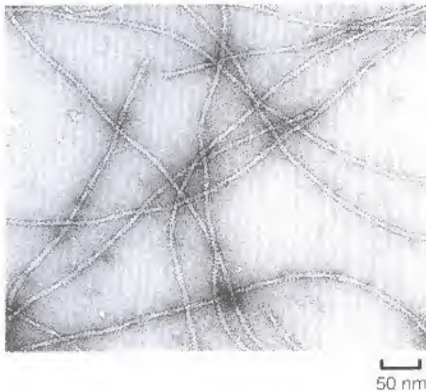
LOS ORGÁNULOS INTRACELULARES de los que se ha hablado en los Capítulos precedentes constituyen un nivel de la estructura subcelular de las células eucariotas. Un nivel de organización más avanzado lo proporciona el citoesqueleto, que consiste en una red de filamentos de proteína que se extienden por el citoplasma de todas las células eucariotas. El citoesqueleto proporciona un armazón estructural para la célula, actuando como un andamio que determina la forma celular y la organización general del citoplasma. Además de desempeñar este papel estructural, el citoesqueleto es el responsable de los movimientos de la célula. Estos no solamente incluyen los movimientos de la célula en conjunto, sino también el transporte interno de los orgánulos y de otras estructuras (tales como los cromosomas mitóticos) a través del citoplasma. Es importante señalar que el citoesqueleto es mucho menos rígido y estable de lo que su nombre indica. Más bien es una estructura dinámica que se reorganiza continuamente según las células se mueven y cambian su forma, por ejemplo durante la división celular.

El citoesqueleto está constituido por tres tipos principales de filamentos de proteína: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos, que se mantienen juntos y unidos a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática mediante varias proteínas accesorias. Este Capítulo trata sobre la estructura y la organización de cada uno de los tres componentes principales del citoesqueleto, así como del papel que desempeñan en la motilidad celular, en el transporte de orgánulos, en la división celular y en otros tipos de movimientos celulares.

## Estructura y organización de los filamentos de actina

La proteína citoesquelética más importante de la mayoría de las células es la **actina**, que polimeriza para formar filamentos de actina —fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud (Fig. 11.1)—. Dentro de la célula, los filamentos de actina (también llamados **microfilamentos**) se organizan en estructuras de un orden superior, formando haces o redes tridimensionales con las propiedades de un gel semisólido. El ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, sus uniones cruzadas constituyendo haces y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (tales como la membrana plasmática) se regulan mediante diversas proteínas de unión a la actina, que son componentes críticos del citoesqueleto de actina. Los filamentos de actina abundan sobre todo debajo de la membrana plasmática, donde forman una red que proporciona un soporte mecánico, determina la forma celular, y permite el movimiento de la superficie celular, lo que permite a las células migrar, engullir partículas, y dividirse.

*Figura 11.1*
**Filamentos de actina.** Micrografía electrónica de filamentos de actina. (Cortesía de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)




## *Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina*

La actina se aisló por primera vez en 1942 a partir de células musculares, en las que constituye aproximadamente el 20 % de la proteína total de la célula. Aunque en un principio se pensó que la actina estaba implicada únicamente en la contracción muscular, ahora se sabe que es una proteína muy abundante (en general entre un 5 y un 10 % de la proteína total) en toda clase de células eucariotas. Las levaduras sólo tienen un gen para la actina, pero los eucariotas superiores tienen varios tipos distintos de actina que se encuentran codificados por distintos miembros de la familia de los genes de la actina. Los mamíferos, por ejemplo, tienen al menos seis genes de actina diferentes: cuatro se expresan en distintos tipos de músculo y dos se expresan en células no musculares. Sin embargo, todas las actinas tienen una secuencia de aminoácidos similar y se han mantenido muy conservadas a lo largo de la evolución de los eucariotas. Por ejemplo, la actina de la levadura tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en un 90 % a la de las actinas de las células de los mamíferos. Una proteína denominada MreB, responsable de la estructura bacilar de las bacterias, ha sido identificada recientemente como el precursor procariota de la actina.

La estructura tridimensional tanto de las moléculas individuales como de los filamentos de actina fueron determinadas en 1990 por Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch, y sus colaboradores. Las moléculas individuales de actina son proteínas globulares de 375 aminoácidos (43 kDa). Cada monómero (**actina globular G**) tiene sitios de unión que median la interacción cabeza con cola con otros dos monómeros de actina, de tal manera que los monómeros de actina polimerizan para formar filamentos (**actina filamentosa F**) (Fig. 11.2). En los filamentos cada monómero se encuentra girado 166°, por lo que los filamentos tienen la apariencia de una hélice de doble cadena. Debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, los filamentos de actina presentan una polaridad diferenciada y sus extremos (denominados extremos «más» y «menos») se distinguen entre sí. Esta polaridad de los filamentos de actina es importante tanto para su ensamblaje como para establecer una dirección única en el movimiento de la miosina respecto a la actina, como se tratará más adelante en el Capítulo.

El ensamblaje de los filamentos de actina puede ser estudiado *in vitro* regulando la fuerza iónica de la solución de actina. En soluciones de baja fuerza iónica los filamentos de actina se despolimerizan a monómeros. La actina polimeriza espontáneamente si se aumenta la fuerza iónica hasta niveles fisiológicos. El primer paso en la polimerización de la actina (denominado nucleación) es la formación de un pequeño agregado constituido por tres monómeros de actina. Los filamentos de actina son entonces capaces de crecer por la adición reversible de monómeros a ambos extremos, pero uno de ellos (el extremo «más») crece de cinco a diez veces más rápido que el extremo «menos». Los monómeros de actina también unen ATP, el cual se hidroliza a ADP tras el ensamblaje del filamento. Aunque el ATP no es necesario para la polimerización, los monómeros de actina que tienen unido ATP polimerizan más rápido que aquellos que tienen unido ADP. Como se describe a continuación, la unión y la hidrólisis del ATP desempeñan un papel clave en la regulación del ensamblaje y en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina.

Debido a que la polimerización de la actina es reversible, los filamentos pueden despolimerizar por la disociación de las subunidades de actina, lo que permite que los filamentos de actina se descompongan cuando sea necesario (Fig. 11.3). De esta forma, existe un equilibrio aparente entre los monómeros de actina y los filamentos, que depende de la concentración de los monómeros libres. La velocidad a la que los monómeros de actina se incorporan a los filamentos es proporcional a su concentración, por lo que hay una concentración crítica de monómeros de actina a la cual la velocidad de polimerización es igual a la velocidad de disociación. A esta concentración crítica, los monómeros y los filamentos se encuentran en un equilibrio aparente.

(A)

Actina G

Dímero

Trímero

extremo –

extremo +

Actina F

(B)

extremo –

C

N

extremo +

(C)

*Figura 11.2*
**Ensamblaje y estructura de los filamentos de actina.** (A) Los monómeros de actina (actina G) polimerizan para formar filamentos de actina (actina F). El primer paso es la formación de dímeros y trímeros, que crecen por la adición de monómeros a ambos extremos. (B) Estructura de un monómero de actina. (C) Modelo espacial de una actina F. Se representan catorce monómeros de actina en diferentes colores (C, Basado en datos de Chen et al. 2002. *J. Struct. Biol.* 138:92.)

Como se mencionó anteriormente, los dos extremos de un filamento de actina crecen a velocidades diferentes, de tal manera que los monómeros se añaden al extremo de crecimiento rápido (el extremo «más») de cinco a diez veces más rápido que al extremo («menos») de crecimiento lento. Debido a que la actina-ATP se disocia con menos facilidad que la actina-ADP, la concentración crítica de monómeros que es necesaria para la polimerización de los dos extremos será diferente. Esta diferencia puede dar lugar al fenómeno conocido como **intercambio rotatorio (*treadmilling*)**, que ilustra el comportamiento dinámico de los filamentos de actina (Fig. 11.4). Para que el sistema se encuentre en un estado de equilibrio general, la concentración de monómeros de actina libres debe ser intermedia entre las concentraciones críticas requeridas para la polimerización de los extremos más y menos de los filamentos de actina. Bajo estas condiciones existe una pérdida neta de monómeros del extremo «menos», que se compensa con una adición neta al extremo «más». El intercambio rotatorio requiere ATP, polimerizando la actina-ATP en el extremo «más» de los filamentos mientras que la actina-ADP se disocia del extremo «menos». Aunque no está claro el papel del intercambio rotatorio en la célula, puede reflejar el

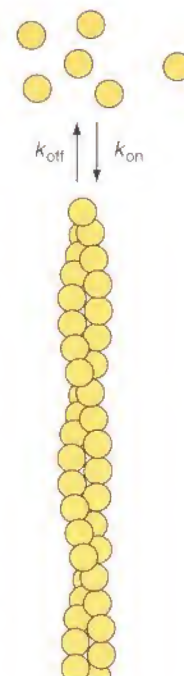



*Figura 11.3*
**Polimerización reversible de los monómeros de actina.** La polimerización de la actina es un proceso reversible, en el que los monómeros se asocian y disocian de los extremos de los filamentos de actina. La velocidad de disociación de las subunidades ($k_{off}$) es independiente de la concentración de monómeros, mientras que la velocidad de asociación de las subunidades es proporcional a la concentración de monómeros libres y viene dada por $C \times k_{on}$ ($C$ = concentración de monómeros libres). A la concentración crítica de monómeros ($C_c$), donde $k_{off} = C_c \times k_{on}$, se alcanza un equilibrio aparente.

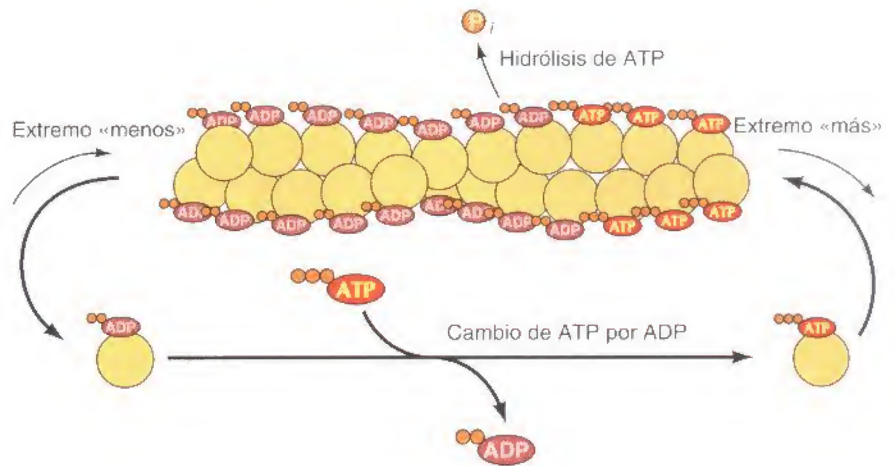



*Figura 11.4*
**Intercambio rotatorio (*treadmilling*).** Los extremos «menos» de los filamentos de actina crecen más despacio que los extremos «más». Esta diferencia en la velocidad de crecimiento se refleja en una diferencia en la concentración crítica necesaria para la adición de monómeros a los dos extremos del filamento. La actina unida a ATP se asocia al extremo «más» de crecimiento rápido, y entonces el ATP unido a la actina se hidroliza a ADP. Debido a que la actina-ADP se disocia de los filamentos con más facilidad que la actina-ATP, la concentración crítica de los monómeros de actina es más alta para su adición al extremo «menos» que para su adición al extremo «más» de los filamentos de actina. El intercambio rotatorio ocurre a una concentración de monómeros intermedia entre las concentraciónes críticas de los extremos «más» y «menos». Bajo estas condiciones, hay una disociación neta de monómeros (unidos a ADP) desde el extremo «menos», compensada por la adición de monómeros (unidos a ATP) al extremo «más».

ensamblaje y desensamblaje dinámico de los filamentos de actina que requieren las células para moverse y cambiar de forma.

Es de reseñar que varios fármacos que se utilizan en biología celular actúan uniéndose a la actina y afectando a su polimerización. Por ejemplo, las **citocalasinas** se unen a los extremos «más» de los filamentos y bloquean su elongación. Esto provoca cambios en la forma de la célula así como la inhibición de algunos tipos de movimientos celulares (p. ej., la división celular que sigue a la mitosis), lo que indica que la polimerización de la actina es necesaria para estos procesos. Otro fármaco, la **faloidina**, se une fuertemente a los filamentos de actina y evita su disociación en moléculas individuales de actina. La faloidina marcada con un marcador fluorescente se suele utilizar para visualizar los filamentos de actina mediante microscopía de fluorescencia.

En la célula tanto el ensamblaje como el desensamblaje de los filamentos de actina son regulados por **proteínas de unión a la actina**. El reciclaje de los filamentos de actina es cerca de 100 veces más rápido en el interior de la célula de lo que es *in vitro*, y este rápido reciclaje de la actina desempeña un papel crítico en diversos movimientos celulares. Por ejemplo, los filamentos de actina densamente empaquetados presentes en el frente de avance de las células en migración (descrito más adelante en este capítulo) pueden ensamblarse en segundos. La clave para comprender este proceso se obtuvo con el descubrimiento en 1994 por Tom Pollard y sus colaboradores de un complejo de proteínas, el **complejo Arp2/3**, que se une a la actina/ATP presente en el extremo positivo de los microfilamentos (Fig. 11.5). El complejo Arp2/3 contiene siete proteínas, dos de las cuales son similares a la actina. El complejo por sí solo posee muy

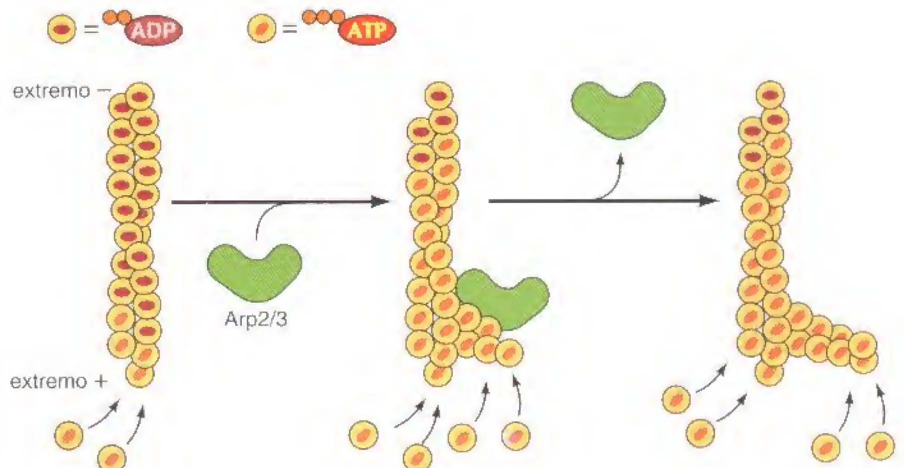



*Figura 11.5*
**Iniciación de ramas en los filamentos de actina.** El complejo Arp2/3 se une a los filamentos de actina cerca de los extremos positivos e inicia la formación de ramas.

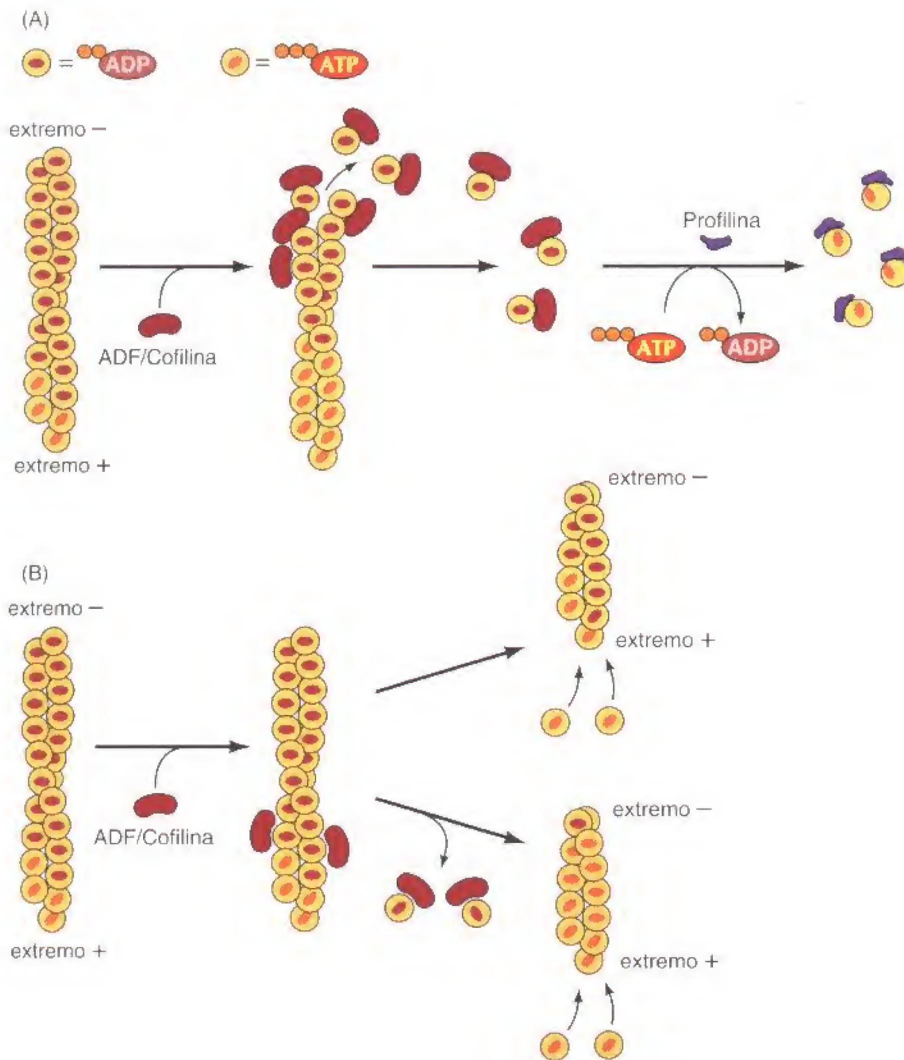



*Figura 11.6*
**Efectos de la ADF/cofilina y la profilina sobre los filamentos de actina.** La ADF/cofilina posee dos actividades diferentes. (A) Es un factor de despolimerización de la actina, uniéndose a los filamentos de actina y aumentando la tasa de disociación de monómeros de actina desde el extremo negativo. La ADF/cofilina permanece unida a los monómeros de ADP/actina, impidiendo su reinserción en los filamentos. (B) La ADF/cofilina también se une y escinde filamentos de actina, creando nuevos extremos positivos.

baja actividad, pero es activado por diversas proteínas que se unen y lo activan. Una vez activado, el complejo Arp2/3 se une al lado de un filamento de actina existente cerca del extremo positivo y forma una nueva rama.

Una segunda familia de proteínas responsable de la remodelación de los filamentos de actina en el interior celular es la famila **ADF/cofilina** (*actin depolymerizing factor*) (Fig. 11.6). Estas proteínas se unen a los filamentos de actina y favorecen la tasa de disociación de los monómeros de actina/ADP del extremo negativo. La ADF/cofilina también puede romper los filamentos de actina generando más extremos positivos, favoreciendo aún más el ensamblaje de filamentos. La ADF/cofilina se une preferentemente a la ADP/actina, de modo que permanece unida a los monómeros de actina después del desensamblaje de los filamentos y los secuestra en la forma unida a ADP, impidiendo su reincorporación en filamentos. Sin embargo, otra proteína de unión a actina, la **profilina**, puede revertir este efecto de la cofilina y estimular la incorporación de monómeros de actina en filamentos. La profilina actúa estimulando el intercambio de ADP por ATP, resultando en la formación de monómeros de actina/ATP, que se disocian de la cofilina y así se encuentran disponibles para su ensamblaje en filamentos.

Como cabría esperar, las actividades de la cofilina, profilina y el complejo Arp2/3 están controlados por una variedad de mecanismos señalizadores celulares (estudiados en el Capítulo 13), que permiten que la polimerización de actina se regule apropiadamente en respuesta a estímulos ambientales. Así, la ADF/cofilina, la profilina y el complejo Arp2/3 (además de otras proteínas de unión a actina)

pueden actuar conjuntamente para estimular la renovación de los filamentos de actina y la remodelación del citoesqueleto de actina, lo que es necesario para una diversidad de movimientos celulares y cambios en la forma de la célula. Esto es una gran tarea y, en algunos tipos celulares, el ensamblaje y desensamblaje de los microfilamentos es responsable de la mitad de la hidrólisis de ATP en la célula.

## *Organización de los filamentos de actina*

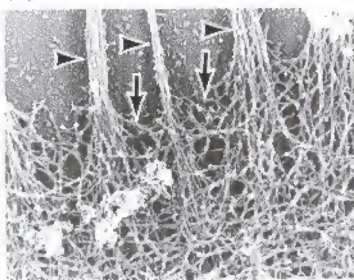
Los filamentos individuales de actina se ensamblan en dos tipos generales de estructuras, denominadas **haces de actina** y **redes de actina**, que desempeñan papeles distintos en la célula (Fig. 11.7). En los haces, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados y se disponen en estructuras paralelas estrechamente agrupadas. En las redes, los filamentos de actina se unen por puentes cruzados con una disposición ortogonal más holgada, y forman mallas tridimensionales con las propiedades de los geles semisólidos. La formación de estas estructuras está dirigida por varias proteínas de unión a la actina que entrelazan los filamentos de actina de maneras distintas.

Todas las proteínas de unión a la actina relacionadas con los puentes cruzados contienen al menos dos dominios de unión a la actina, lo que les permite fijar y entrecruzar dos filamentos de actina diferentes. La naturaleza de la asociación entre estos filamentos viene entonces determinada por el tamaño y la forma de las proteínas de entrecruzamiento (véase Fig. 11.7). Las proteínas que entrelazan los filamentos de actina en haces (llamadas **proteínas formadoras de haces de actina**) suelen ser pequeñas proteínas rígidas que fuerzan a los filamentos a alinearse estrechamente unos con otros. Por otro lado, las proteínas que organizan los filamentos de actina en redes tienden a ser proteínas largas y flexibles que pueden establecer puentes de unión entre filamentos perpendiculares. Estas proteínas formadoras de puentes entrecruzados de actina parecen ser proteínas modulares constituidas por unidades estructurales relacionadas. Concretamente, los dominios de unión a la actina de muchas de estas proteínas tienen una estructura similar. Están separados por secuencias espaciadoras que varían en longitud y flexibilidad, y son estas diferencias en las secuencias espaciadoras las responsables de las distintas propiedades de entrecruzamiento de las diferentes proteínas de unión a la actina.

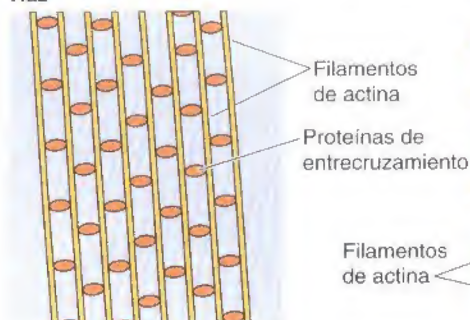
Existen dos tipos de haces de actina distintos tanto estructural como funcionalmente, que implican a diferentes proteínas formadoras de haces de actina (Fig. 11.8). El primer tipo de haz, que contiene filamentos de actina estrechamente agrupados, alineados en paralelo, sostiene a las proyecciones de la membrana plasmática tales como las microvellosidades (véanse Figs. 11.16 y 11.17). En estos haces todos los filamentos tienen la misma polaridad, con sus extremos «más» adyacentes a la membrana plasmática. Un ejemplo de proteína formadora de haces, relacionada con la formación de estas estructuras es la **fimbrina**, que fue aislada por primera vez a partir de las microvellosidades intestinales, y más tarde se encontró en las proyecciones de superficie de una amplia

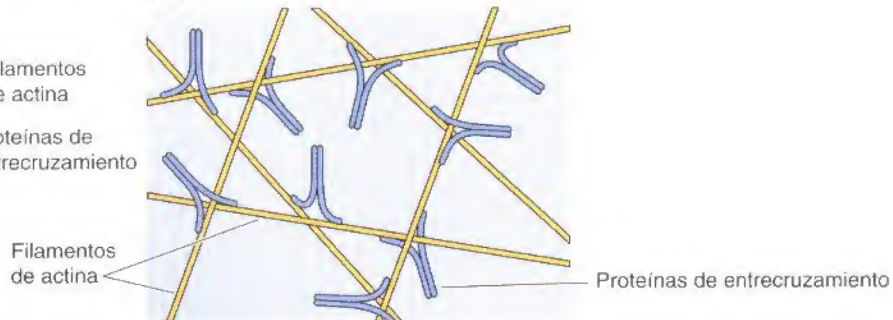
*Figura 11.7*
**Haces y redes de actina.** (A) Micrografía electrónica de haces de actina (cabezas de flecha) proyectándose desde la red de actina (flechas) subyacente a la membrana plasmática de un macrófago. Los haces sostienen unas proyecciones de la superficie celular llamadas micropúas o filopodios (véase Fig. 11.17). (B) Organización esquemática de los haces y las redes. Los filamentos de actina en los haces se disponen en formaciones paralelas unidos por puentes cruzados por proteínas pequeñas que alinean los filamentos estrechamente unos con otros. Por el contrario, las redes se encuentran formadas por proteínas grandes y flexibles que entrelazan filamentos ortogonales. (A, cortesía de John H. Hartwig, Brigham & Women's Hospital.)

(A)




(B)



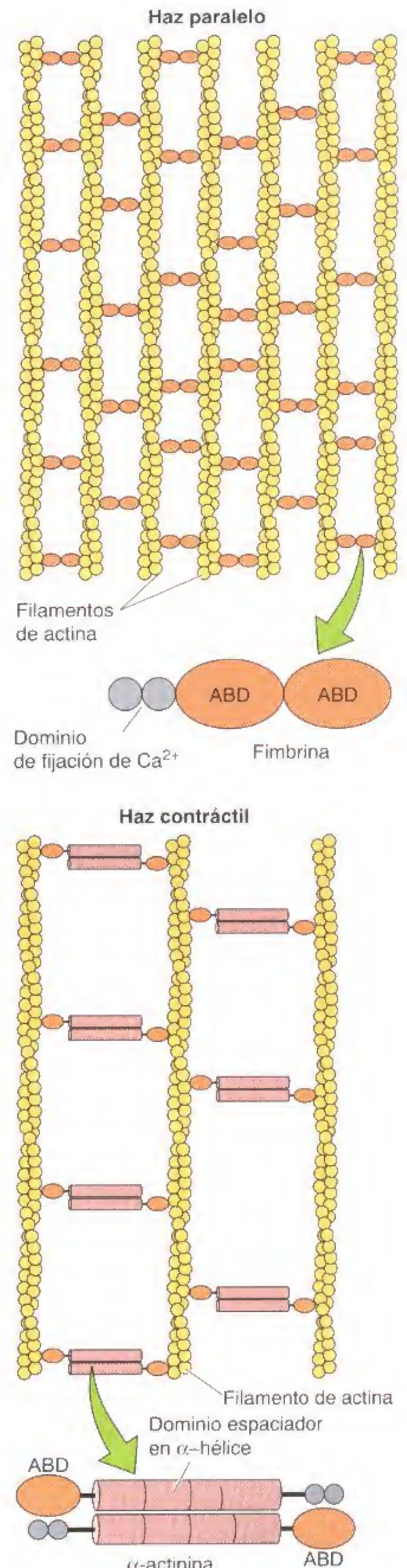



*Figura 11.8*
**Proteínas formadoras de haces de actina.** Los filamentos de actina se asocian en dos tipos de haces mediante diferentes proteínas formadoras de haces de actina. La fimbrina tiene dos dominios de unión a la actina adyacentes (ABD) y entrelaza filamentos de actina en haces paralelos, estrechamente empaquetados, en los que los filamentos se encuentran separados aproximadamente 14 nm. Por otro lado, los dos dominios de unión a actina separados de los dímeros de α-actinina entrelazan los filamentos en haces contráctiles más holgados y espaciados, en los que los filamentos se encuentran separados 40 nm. Tanto la fimbrina como la α-actinina contienen dos dominios de fijación de $Ca^{2+}$ relacionados, y la α-actinina contiene cuatro dominios espaciadores en α-hélice repetidos.

variedad de tipos de células. La fimbrina es una proteína de 68 kDa que contiene dos dominios adyacentes de unión a la actina. Se une a los filamentos de actina en forma de monómero, manteniendo unidos a dos filamentos paralelos.

El segundo tipo de haz de actina se compone de filamentos que están más espaciados y que son capaces de contraerse, tales como los haces de actina del anillo contráctil que divide a las células en dos tras la mitosis. La estructura más holgada de estos haces (que se denominan **haces contráctiles**) refleja las propiedades de la proteína de entrecruzamiento **α-actinina**. A diferencia de la fimbrina, la α-actinina se une a la actina como un dímero, siendo cada una de las subunidades una proteína de 102 kDa que contiene un único sitio de unión a la actina. Por lo tanto, los filamentos entrelazados por la α-actinina se encuentran separados por una distancia mucho mayor que aquellos unidos por la fimbrina (40 nm de separación frente a 14 nm). La mayor separación entre los filamentos permite a la proteína motora miosina interaccionar con los filamentos de actina en estos haces, permitiéndo (como se verá más adelante) su contracción.

En las redes los filamentos de actina se mantienen unidos mediante proteínas de unión a la actina de gran tamaño, como la **filamina** (Fig. 11.9). La filamina (también conocida como proteína de unión a la actina 280 o ABP-280) se fija a la actina como un dímero de dos subunidades de 280 kDa. Los dominios de unión a la actina y los dominios de dimerización se encuentran en extremos opuestos de cada subunidad, por lo que el dímero de filamina es una molécula flexible en forma de V con los dominios de unión a la actina en los extremos de cada brazo. Como resultado, la filamina forma puentes cruzados entre filamentos de actina ortogonales, creando una malla tridimensional holgada. Tal y como se tratará en la próxima sección, dicha red de filamentos de actina subyace a la membrana plasmática y es un soporte estructural de la superficie de la célula.

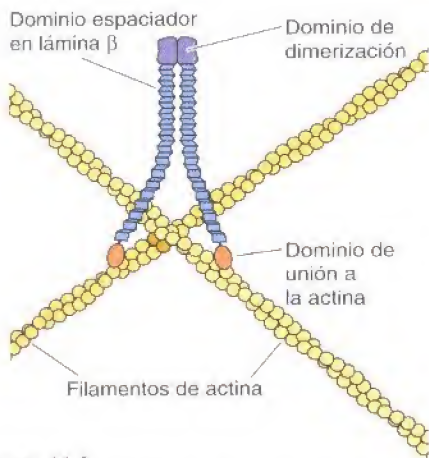



*Figura 11.9*
**Redes de actina y la filamina.** La filamina es un dímero de dos subunidades grandes (280 kDa), que forman una molécula flexible en forma de V y que entrelaza los filamentos de actina en redes ortogonales. El dominio de dimerización carboxilo-terminal se encuentra separado del dominio de unión a la actina amino-terminal por dominios espaciadores en lámina β repetidos.

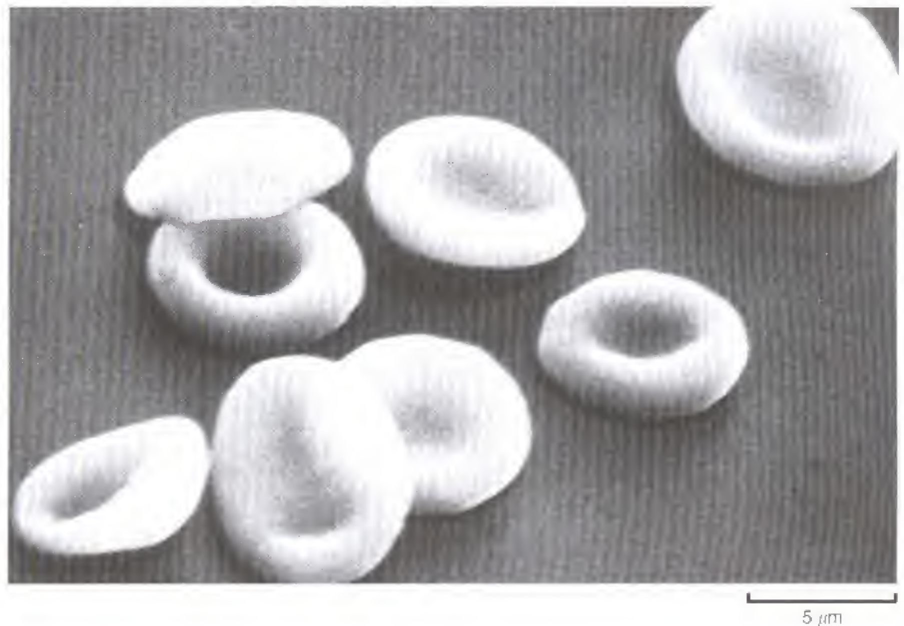



*Figura 11.10*
**Morfología de los glóbulos rojos sanguíneos.** Micrografía electrónica de barrido de glóbulos rojos mostrando su forma bicóncava. (Omikron/Photo Researchers, Inc.)

La localización de diferentes tipos de redes y haces de actina en regiones específicas de la célula está controlada, en parte, por otra familia de proteínas de unión a actina, la familia tropomiosina (estudiada más adelante).

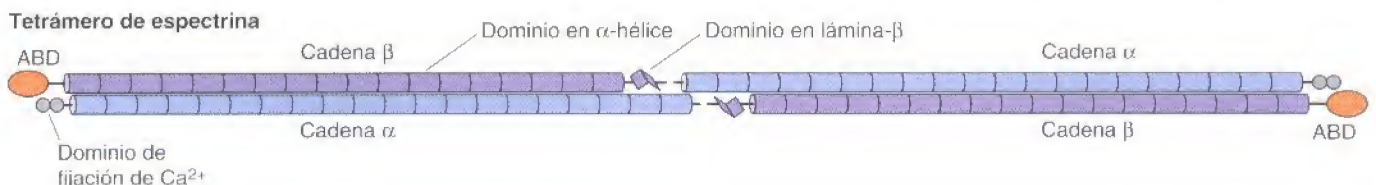
### *Asociaciación de los filamentos de actina con la membrana plasmática*

En la periferia de la célula hay una elevada concentración de filamentos de actina que forman una red tridimensional bajo la membrana plasmática (véase Fig. 11.7). Esta red de filamentos de actina y de proteínas de unión a la actina asociadas (denominada el **córtex celular**) determina la forma de la célula y está implicada en diversas acciones de la superficie celular, incluyendo el movimiento. De esta manera, la asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es fundamental para la estructura y la función celular.

Los glóbulos rojos sanguíneos (eritrocitos) han demostrado ser particularmente útiles para el estudio tanto de la membrana plasmática (que se tratará en el próximo Capítulo) como del citoesqueleto cortical. La principal ventaja de los glóbulos rojos para estos estudios radica en que no contienen ni núcleo ni orgánulos internos, por lo que la membrana plasmática y las proteínas asociadas pueden ser aisladas fácilmente sin ser contaminadas por las diferentes membranas internas que son abundantes en otros tipos de células. Además, los eritrocitos humanos carecen de otros componentes citoesqueléticos (microtúbulos o filamentos intermedios), por lo que el citoesqueleto cortical es el determinante principal de su morfología característica en forma de discos bicóncavos (Fig. 11.10).

La principal proteína que proporciona la base estructural del citoesqueleto cortical en los eritrocitos es la proteína de unión a la actina, **espectrina**, relacionada con la filamina (Fig. 11.11). La espectrina eritrocitaria es un tetrámero constituido por dos cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas $\alpha$ y $\beta$, con

*Figura 11.11*
**Estructura de la espectrina.** La espectrina es un tetrámero constituido por dos cadenas $\alpha$ y dos $\beta$. Cada cadena $\beta$ tiene un único dominio de unión a la actina (ABD) en su extremo amino terminal. Tanto las cadenas $\alpha$ como $\beta$ contienen múltiples repeticiones de dominios espaciadores en $\alpha$-hélice, que separan los dos dominios de unión de la actina del tetrámero. La cadena $\alpha$ tiene dos dominios de fijación de $Ca^{2+}$ en su extremo carboxilo terminal.



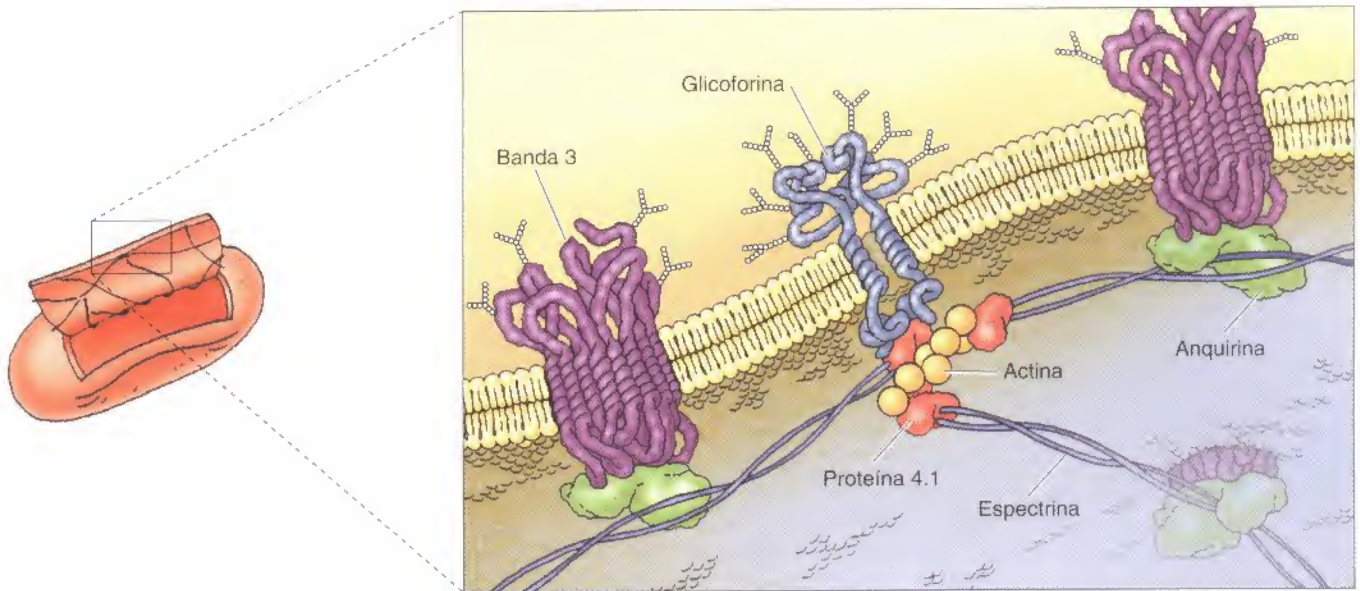



*Figura 11.12*
**Asociación del citoesqueleto cortical eritrocitario con la membrana plasmática.** La membrana plasmática se asocia con una red de tetrámeros de espectrina entrelazada por filamentos cortos de actina asociados con la proteína 4.1. La red de espectrina-actina se une a la membrana por la anquirina, que se une tanto a la espectrina como a la abundante proteína transmembrana banda 3. Un nexo adicional lo proporciona la unión de la proteína 4.1 a la glicoforina.

un peso molecular de 240 y 220 kDa, respectivamente. La cadena $\beta$ presenta un único dominio de unión a la actina en la región amino terminal. Las cadenas $\alpha$ y $\beta$ se asocian lateralmente para formar dímeros, que se unen cabeza con cabeza para formar tetrámeros con dos dominios de unión a la actina separados aproximadamente por 200 nm. Los extremos de los tetrámeros de espectrina se asocian con filamentos cortos de actina, dando como resultado una red de espectrina-actina que forma el citoesqueleto cortical de los glóbulos rojos (Fig. 11.12). El principal nexo de unión entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática lo proporciona la proteína denominada **anquirina**, que se une tanto a la espectrina como al dominio citoplasmático de una proteína transmembrana abundante denominada banda 3. Un nexo adicional entre la red de espectrina-actina y la membrana plasmática viene dado por la proteína 4.1, que se fija a las uniones de espectrina-actina así como reconoce el dominio citoplasmático de la glicoforina (otra proteína transmembrana abundante).

Otros tipos de células contienen uniones entre el citoesqueleto cortical y la membrana plasmática que son similares a las observadas en los glóbulos rojos. Las proteínas relacionadas con la espectrina (la espectrina no-eritroide también se denomina **fodrina**), la anquirina, y la proteína 4.1 se expresan en una gran variedad de tipos celulares, donde realizan funciones análogas a aquellas descritas para los eritrocitos. Por ejemplo, una familia de proteínas relacionada con la proteína 4.1 (las **proteínas ERM**) unen los filamentos de actina a la membrana plasmática de muchas clases de células, y la proteína similar a la espectrina filamina (véase Fig. 11.8) constituye el principal puente entre los filamentos de actina y la membrana plasmática de las plaquetas sanguíneas. Otro miembro de este grupo de proteínas relacionadas con la espectrina es la **distrofina**, que tiene un interés especial debido a que es el producto del gen responsable de dos tipos de distrofias musculares (la de Duchenne y Becker). Estas enfermedades congénitas asociadas al cromosoma X provocan una degeneración progresiva del músculo esquelético, y los pacientes con la forma más severa de la enfermedad (distrofia muscular de Duchenne) generalmente mueren en la adolescencia o alrededor de los veinte años de edad. La clonación molecular del gen responsable de este desorden reveló que codifica una proteína de gran tamaño (427 kDa) que se encuentra ausente o alterada en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker, respectivamente. La secuencia de la distrofina indicó además que está relacionada con la espectrina, con un único dominio de unión a la actina en su extremo amino terminal y un dominio de fijación a la membrana en su extremo carboxilo terminal. Al igual que la espectrina, la distrofina




*Figura 11.13*
**Fibras de estrés y adhesiones focales.** Microscopía de fluorescencia de un fibroblasto humano en el que los filamentos de actina se han teñido con un marcador fluorescente. Las fibras de estrés se muestran como haces de filamentos de actina anclados a sitios donde la célula se une a la superficie de la placa de cultivo (adhesiones focales). (Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

forma dímeros que fijan los filamentos de actina a las proteínas transmembrana de la membrana plasmática de la célula muscular. Estas proteínas transmembrana a su vez fijan el citoesqueleto a la matriz extracelular, lo que desempeña un papel importante en mantener la estabilidad celular durante la contracción muscular.

A diferencia de la superficie uniforme de los glóbulos rojos sanguíneos, la mayoría de las células tienen regiones especializadas en la membrana plasmática que establecen contactos con células adyacentes, componentes tisulares, u otros substratos (como la superficie de una placa de cultivo). Estas regiones también sirven como puntos de unión para los haces de filamentos de actina que anclan el citoesqueleto a las zonas de contacto celular. Estas uniones de filamentos de actina resultan particularmente evidentes en los fibroblastos en cultivo (Fig. 11.13). Estos fibroblastos en cultivo segregan proteínas de la matriz extracelular (véase Cap. 12) que se adhieren a la superficie plástica de la placa de cultivo. Entonces los fibroblastos se unen a la placa de cultivo mediante la unión a la matriz extracelular de unas proteínas transmembrana (denominadas **integrinas**). Los sitios de anclaje son regiones discretas (llamadas **adhesiones focales**) que también sirven como sitios de sujeción para unos haces de filamentos de actina de gran tamaño denominados **fibras de estrés**.

Las fibras de estrés son haces contráctiles de filamentos de actina, entrelazados por α-actinina, que anclan a la célula y ejercen tensión sobre el sustrato. Están unidas a la membrana plasmática en las adhesiones focales a través de la integrina. Estas asociaciones, que son complejas y no bien entendidas, pueden estar mediadas por otras proteínas, incluyendo la **talina** y la **vinculina** (Fig. 11.14). Por ejemplo, tanto la talina como la α-actinina se unen a los dominios citoplasmáticos de las integrinas. La talina también se une a la vinculina, que a su vez se une a la actina. Otras proteínas encontradas en las adhesiones focales también pueden participar en el anclaje de los filamentos de actina, y una combinación de estas interacciones puede ser la responsable de la unión de los filamentos de actina a la membrana plasmática.

El citoesqueleto de actina se encuentra anclado de forma similar a regiones de contacto célula-célula denominadas **uniones de adherencia** o *adherens* (Fig. 11.15). En las capas de células epiteliales estas uniones forman una es-

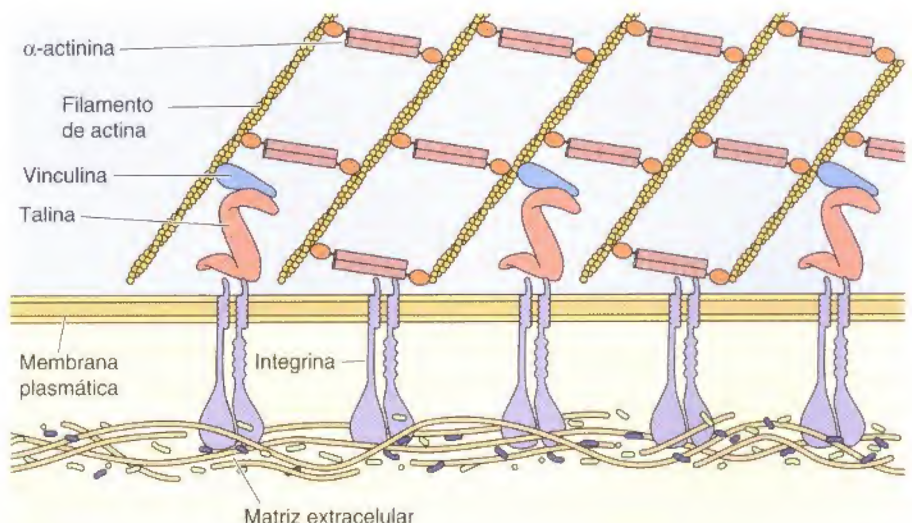
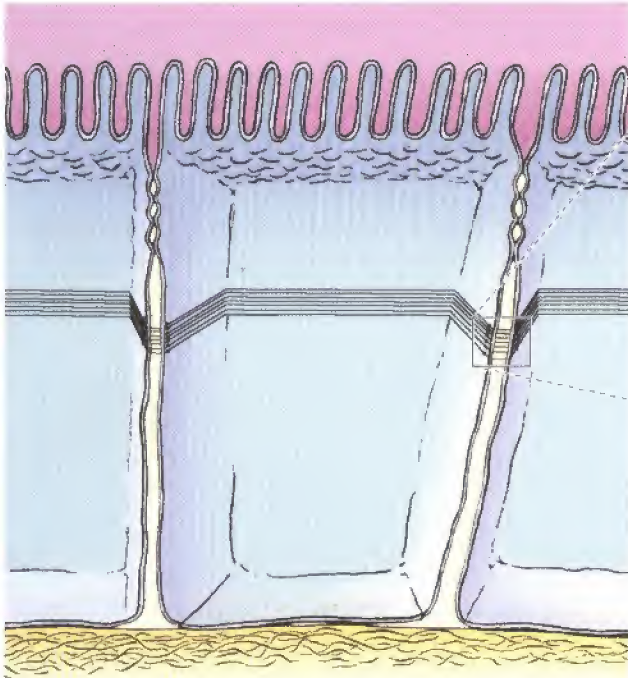



*Figura 11.14*
**Anclaje de las fibras de estrés a la membrana plasmática en las adhesiones focales.** Las adhesiones focales están mediadas por la unión de las integrinas a proteínas de la matriz extracelular. Las fibras de estrés (haces de filamentos de actina entrelazados por α-actinina) se unen al dominio citoplasmático de las integrinas mediante asociaciones complejas en las que intervienen un cierto número de proteínas. Se muestran dos posibles asociaciones: 1) La talina se une a la integrina y a la vinculina, que a su vez se une a la actina, y 2) la integrina se une a la α-actinina. En las adhesiones focales también se encuentran presentes otras proteínas (que no se representan) y que pueden estar implicadas en el anclaje de las fibras de estrés a la membrana plasmática.



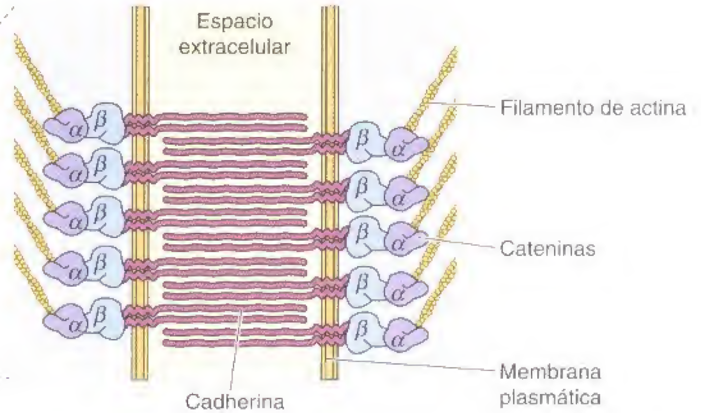



*Figura 11.15*
**Anclaje de los filamentos de actina a las uniones de adherencia.** Los contactos célula-célula en las uniones de adherencia están mediados por cadherinas, que sirven como sitios de unión de los haces de actina. En las capas de células epiteliales estas uniones forman un cinturón continuo de filamentos de actina alrededor de cada célula. Las cadherinas son proteínas transmembrana que unen β-catenina a sus dominios citoplasmáticos. La β-catenina interacciona con la α-catenina, que actúa como nexo para los filamentos de actina.

tructura continua en forma de cinturón (denominada **cinturón de adhesión**) alrededor de cada célula, de tal manera que un haz contráctil de filamentos de actina subyacente se une a la membrana plasmática. El contacto entre las células en las uniones de adherencia está mediado por proteínas transmembrana llamadas **cadherinas**, que serán tratadas en el Capítulo 12. Las cadherinas forman un complejo con las proteínas citoplasmáticas denominadas **cateninas**, que se asocian con los filamentos de actina.

## *Protuberancias de la superficie celular*

La superficie de la mayoría de las células tiene diversas protuberancias o extensiones que intervienen en el movimiento celular, la fagocitosis, o en funciones especializadas tales como la absorción de los nutrientes. La mayoría de estas extensiones celulares superficiales se basan en filamentos de actina, que están organizados en haces o redes relativamente estables o que se reorganizan rápidamente.

Las protuberancias de la superficie celular basadas en la actina mejor caracterizadas son las **microvellosidades**, extensiones digitiformes de la membrana plasmática que son particularmente abundantes en la superficie de las células implicadas en la absorción, como las células epiteliales que tapizan el intestino (Fig. 11.16). Las microvellosidades de estas células forman una capa sobre la superficie apical (denominada **borde en cepillo**) que consta aproximadamente de un millar de microvellosidades por célula y que aumenta de 10 a 20 veces la superficie útil para la absorción. Además de su papel en la absorción, unas formas especializadas de microvellosidades, los **esterocilios** de las células auditivas, son las responsables de la audición mediante la detección de las vibraciones sonoras.

Su abundancia y facilidad de aislamiento ha facilitado el análisis estructural detallado de las microvellosidades intestinales, las cuales contienen haces paralelos de 20 a 30 filamentos de actina estrechamente agrupados (Fig. 11.17). Los filamentos en estos haces están entrelazados en parte por la fimbrina, una proteína formadora de haces de actina (vista anteriormente) que está presente en las proyecciones superficiales de varios tipos de células. Sin embargo, la proteína formadora de haces de actina más importante en las microvellosidades in-

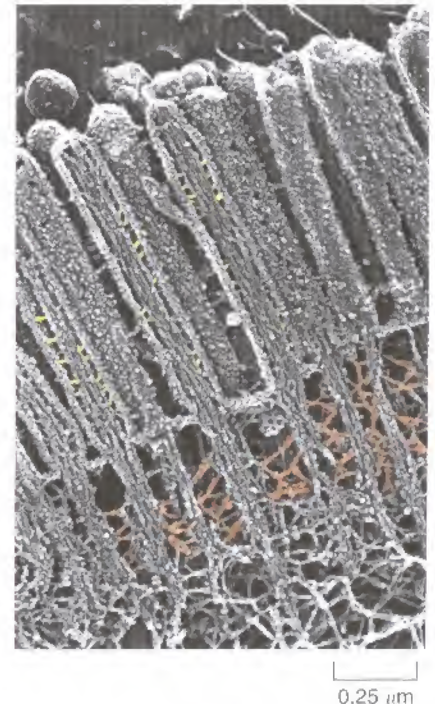



*Figura 11.16*
**Micrografía electrónica de microvellosidades.** Las microvellosidades (flechas) de las células epiteliales intestinales son proyecciones digitiformes de la membrana plasmática. Se sostienen mediante haces de actina anclados en una densa región del córtex llamada la red terminal. (Cortesía de Nobutaka Hirokawa.)

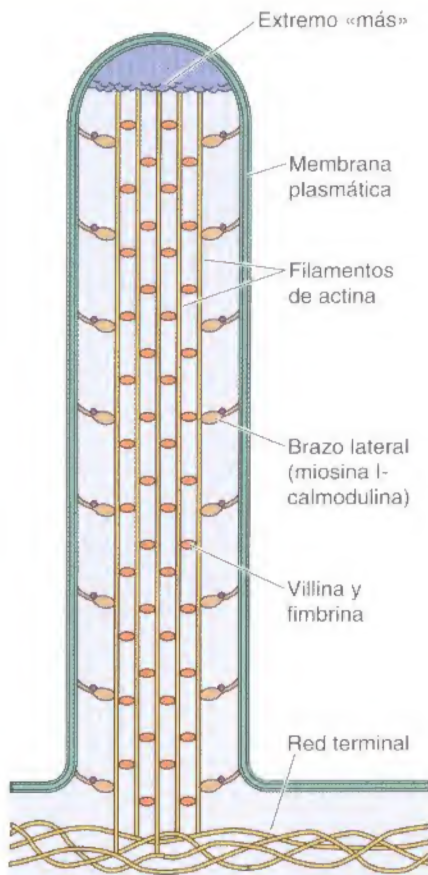


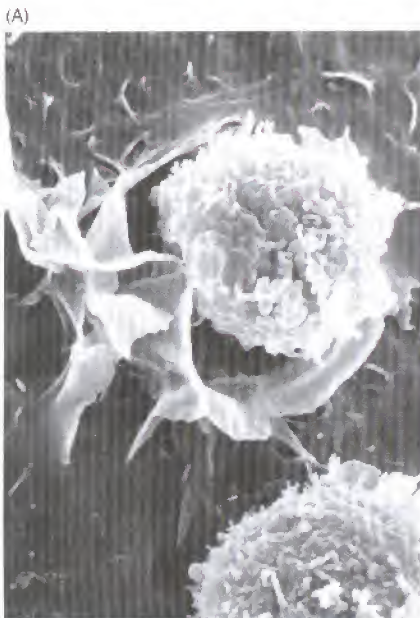

*Figura 11.17*
**Organización de las microvellosidades.** Los filamentos de actina centrales de las microvellosidades se entrelazan mediante la fimbrina y la villina, constituyendo haces estrechamente agrupados. A lo largo de su estructura se unen a la membrana plasmática a través de brazos laterales, constituidos por miosina I y calmodulina. Los extremos «más» de los filamentos de actina están embebidos en una cápsula de proteínas no identificadas en la punta de la microvellosidad.

testinales es la **villina**, una proteína de 95 kDa presente en las microvellosidades de sólo unos pocos tipos de células especializadas, tales como las que tapizan el intestino y los túbulos renales. A lo largo de su estructura, los haces de actina de las microvellosidades se encuentran unidos a la membrana plasmática a través de brazos laterales constituidos por la proteína fijadora de calcio calmodulina en asociación con la miosina I, la cual puede estar implicada en el movimiento de la membrana plasmática a lo largo del haz de actina de la microvellosidad. En su base, los haces de actina están anclados en una región rica en espectrina de la corteza de actina llamada la red terminal, que entrelaza y estabiliza las microvellosidades.

A diferencia de las microvellosidades, muchas protuberancias superficiales son estructuras transitorias que se forman en respuesta a estímulos ambientales. Varios tipos de estas estructuras se extienden desde la parte anterior de la célula en movimiento y están implicados en la locomoción celular (Fig. 11.18). Los **pseudópodos** son extensiones de un ancho moderado, basados en filamentos de actina entrelazados en una red tridimensional, que son responsables de la fagocitosis y del movimiento de las amebas sobre una superficie. Los **lamelipodios** son extensiones anchas, laminares, del borde apical de los fibroblastos, que de forma similar contienen una red de filamentos de actina. Muchas células también extienden **microespinas** o **filopodios**, proyecciones delgadas de la membrana plasmática sustentadas por haces de actina. La formación y retracción de estas estructuras se basa en el ensamblaje y desensamblaje regulado de los filamentos de actina, como se discute en el siguiente apartado.

*Figura 11.18*
**Ejemplos de proyecciones celulares superficiales implicadas en la fagocitosis y el movimiento.** (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando pseudópodos de un macrófago engullendo una célula tumoral durante la fagocitosis. (B) Ameba con varios pseudópodos extendidos. (C ) Célula de cultivo tisular mostrando lamelipodios (L) y filopodios (flecha). (A, K. Wassermann/Visuals Unlimited; B, Stanley Flegler/Visuals Unlimited; C, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

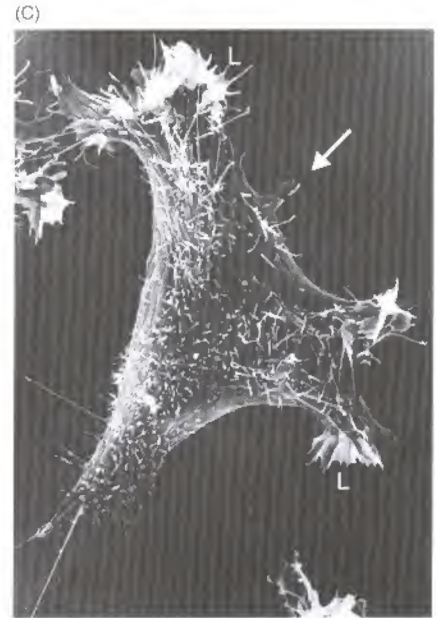
(A)



(B)



(C)



## Actina, miosina y movimiento celular

Los filamentos de actina, generalmente asociados con la **miosina**, son los responsables de muchos tipos de movimientos celulares. La miosina es el prototipo de **motor molecular** —una proteína que convierte energía química en forma de ATP en energía mecánica, generando de esta manera fuerza y movimiento. El tipo de movimiento más sorprendente es la contracción muscular, que ha proporcionado el modelo para comprender las interacciones actina-miosina y la actividad motora de las moléculas de miosina. Sin embargo, las interacciones entre la actina y la miosina son las responsables no sólo de la contracción muscular sino también de diversos tipos de movimientos de las células no musculares, incluyendo la división celular, por lo que estas interacciones desempeñan un papel central en la biología celular. Más aún, el citoesqueleto de actina es el responsable del movimiento de arrastre de las células a lo largo de una superficie, que parece que está dirigido directamente por la polimerización de la actina así como por interacciones actina-miosina.

### *Contracción muscular*

Las células musculares están altamente especializadas en una única tarea, la contracción, y es esta especialización en su estructura y función lo que convierte al músculo en el prototipo para el estudio del movimiento a nivel molecular y celular. Existen tres tipos distintos de células musculares en los vertebrados: músculo esquelético, responsable de todos los movimientos voluntarios; músculo cardíaco, que bombea la sangre desde el corazón; y músculo liso, responsable de los movimientos involuntarios de órganos tales como el estómago, intestino, útero y vasos sanguíneos. Tanto en el músculo esquelético como en el músculo cardíaco, los elementos contráctiles del citoesqueleto aparecen en estructuras altamente organizadas que dan lugar al patrón característico de estriaciones transversales. La caracterización de estas estructuras en el músculo esquelético es lo que nos ha permitido comprender la contracción muscular, y otros movimientos celulares basados en la actina, a nivel molecular.

Los músculos esqueléticos son haces de **fibras musculares**, que son células individuales grandes (de aproximadamente 50 $\mu$m de diámetro y varios centímetros de longitud) formadas por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo (Fig. 11.19). La mayor parte del citoplasma está constituido por **miofibrillas**, que son haces cilíndricos de dos tipos de filamentos: filamentos gruesos de miosina (aproximadamente de 15 nm de diámetro) y filamentos delgados de actina (alrededor de 7 nm de diámetro). Cada miofibrilla

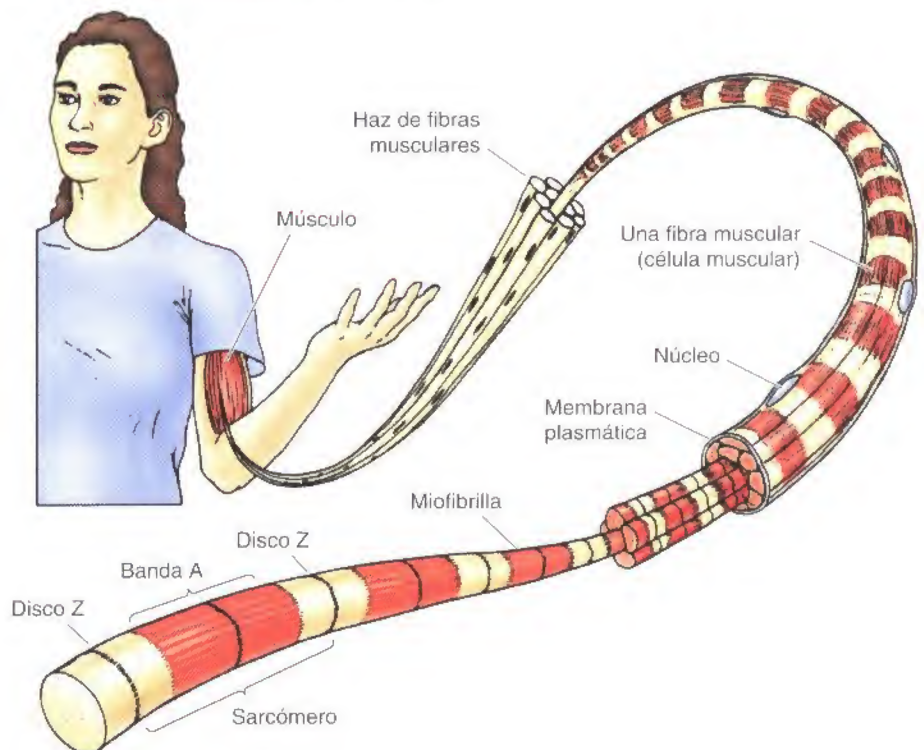



*Figura 11.19*
**Estructura de las células musculares.** Los músculos se componen de haces de células individuales largas (llamadas fibras musculares) que se forman por fusión celular y que contienen múltiples núcleos. Cada fibra muscular contiene muchas miofibrillas, que a su vez son haces de filamentos de actina y miosina organizados en una cadena de unidades repetidas llamadas sarcómeros.

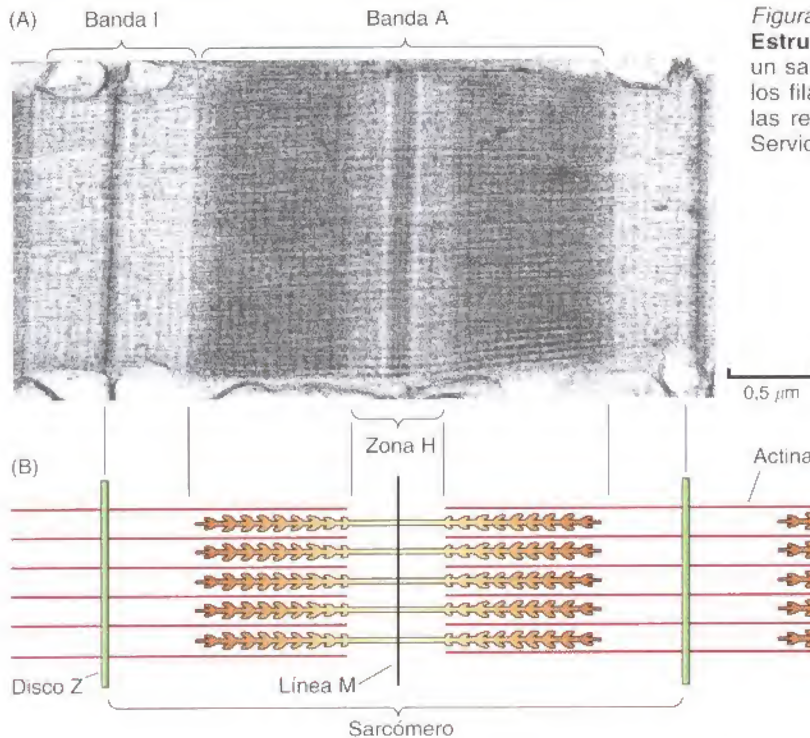



*Figura 11.20*
**Estructura del sarcómero.** (A) Micrografía electrónica de un sarcómero. (B) Diagrama mostrando la organización de los filamentos de actina (delgados) y miosina (gruesos) en las regiones indicadas. (A, Frank A. Pepe/Biological Photo Service.)

se estructura a modo de una cadena de unidades contráctiles llamadas **sarcómeros**, que son los responsables de la apariencia estriada de los músculos cardíaco y esquelético.

Los sarcómeros (que miden aproximadamente 2,3 μm de longitud) constan de varias regiones diferenciadas, discernibles por microscopía electrónica, lo que permitió revelar el mecanismo de la contracción muscular (Fig. 11.20). Los extremos de cada sarcómero vienen delimitados por el disco Z. Dentro de cada sarcómero alternan bandas oscuras (llamadas bandas A porque son *anisótropas cuando se observan con luz polarizada) con bandas claras (llamadas bandas I por ser i*sótropas). Estas bandas se corresponden con la presencia o ausencia de filamentos de miosina. Las bandas I solamente contienen filamentos delgados (de actina), mientras que las bandas A contienen filamentos gruesos (de miosina). Los filamentos de miosina y actina se solapan en regiones periféricas de la banda A, mientras que una región intermedia (llamada zona H) contiene sólo miosina. Los filamentos de actina se unen por sus extremos «más»al disco Z, que contiene la proteína de entrecruzamiento α-actinina. Los filamentos de miosina se unen en la zona media del sarcómero, la línea M.

Otras dos proteínas (**titina** y **nebulina**) también contribuyen a la estructura y estabilidad del sarcómero (Fig. 11.21). La titina es una proteína extremadamente grande (3.000 kDa), y se extienden moléculas individuales de titina desde la línea M hasta el disco Z. Estas largas moléculas de titina se cree que actúan como muelles que mantienen los filamentos de miosina centrados en el sarcó-

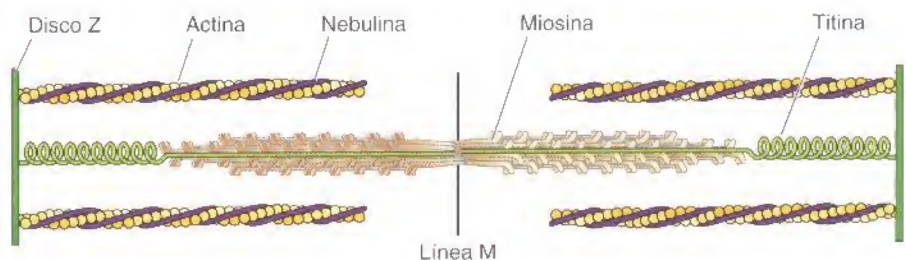



*Figura 11.21*
**Titina y nebulina.** Las moléculas de titina se extienden desde el disco Z hasta la línea M y actúan como muelles que mantienen los filamentos de miosina centrados en el sarcómero. Las moléculas de nebulina se extienden desde el disco Z y se piensa que determinan la longitud de los filamentos de actina asociados.

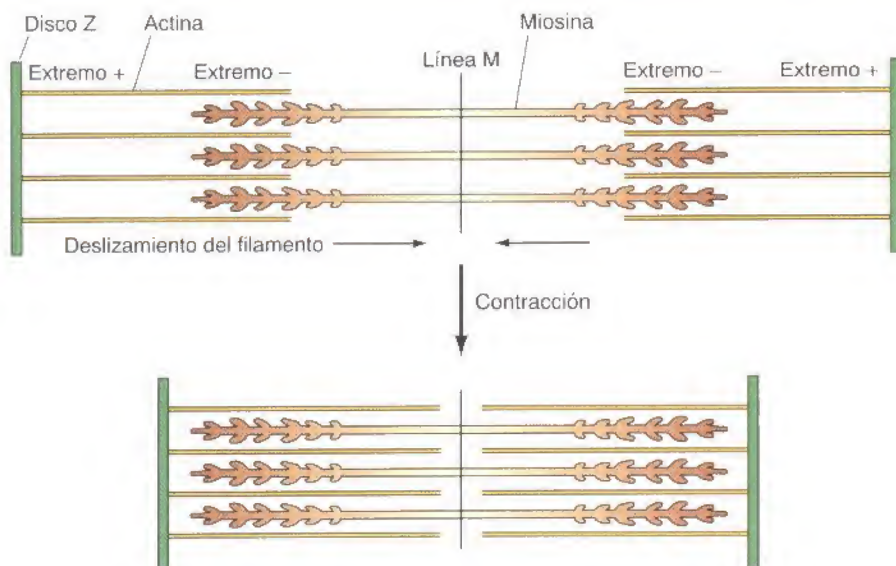



*Figura 11.22*
**Modelo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular.** Los filamentos de actina se deslizan sobre los filamentos de miosina hacia la zona media del sarcómero. El resultado es el acortamiento del sarcómero sin ningún cambio en la longitud de los filamentos.

mero y mantienen la tensión de reposo que permite al músculo retraerse si se extiende en exceso. Los filamentos de nebulina están asociados con la actina y se piensa que regulan el ensamblaje de los filamentos de actina actuando como reglas que determinan su longitud.

La base para comprender la contracción muscular es el **modelo de deslizamiento de los filamentos**, propuesto por primera vez en 1954 por Andrew Huxley y Ralph Niedergerke y por Hugh Huxley y Jean Hanson (Fig. 11.22). Durante la contracción muscular, cada sarcómero se encoge, acercando los discos Z. La amplitud de la banda A no varía, pero tanto las bandas I como la zona H casi desaparecen por completo. Estos cambios se explican porque los filamentos de actina y miosina se deslizan uno sobre otro, por lo que los filamentos de actina ocupan la banda A y la zona H. Por lo tanto, la contracción muscular se debe a la interacción entre los filamentos de actina y miosina que genera el movimiento relativo de uno respecto al otro. La base molecular de esta interacción es la unión de la miosina a los filamentos de actina, lo que permite a la miosina funcionar como un motor que dirige el deslizamiento de los filamentos.

El tipo de miosina presente en el músculo (**miosina II**) es una proteína muy grande (aproximadamente 500 kDa) constituida por dos cadenas pesadas idénticas (alrededor de 200 kDa cada una) y dos pares de cadenas ligeras (alrededor de 20 kDa cada una) (Fig. 11.23). Cada cadena pesada consta de una cabeza globular y de una cola larga en $\alpha$-hélice. Las colas en $\alpha$-hélice de dos cadenas pesadas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*) para formar un dímero, y dos cadenas ligeras se asocian con el cuello de cada región de la cabeza para formar la molécula completa de miosina II.

Los filamentos gruesos del músculo están constituidos por varios cientos de moléculas de miosina, unidas por interacciones entre sus colas, en una disposición paralela escalonada (Fig. 11.24). Las cabezas globulares de miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados. Es importante señalar que la orientación de las moléculas de miosina de los filamentos gruesos se invierte a partir de la línea M del sarcómero. De igual forma, la polaridad de los filamentos de actina (los cuales se unen a los

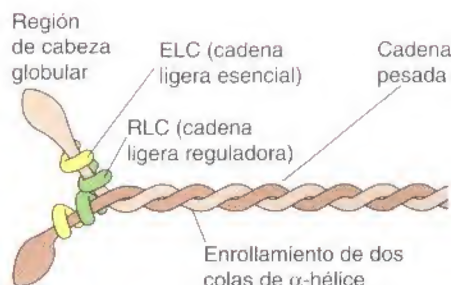



*Figura 11.23*
**Miosina II.** La molécula de miosina II consta de dos cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras (denominadas cadenas ligeras esenciales y reguladoras). Las cadenas pesadas tienen regiones de cabeza globular y colas largas en $\alpha$-hélice, que se enrollan una alrededor de la otra para formar dímeros.

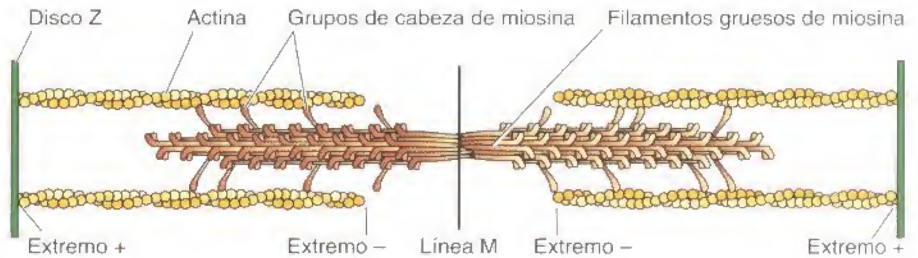
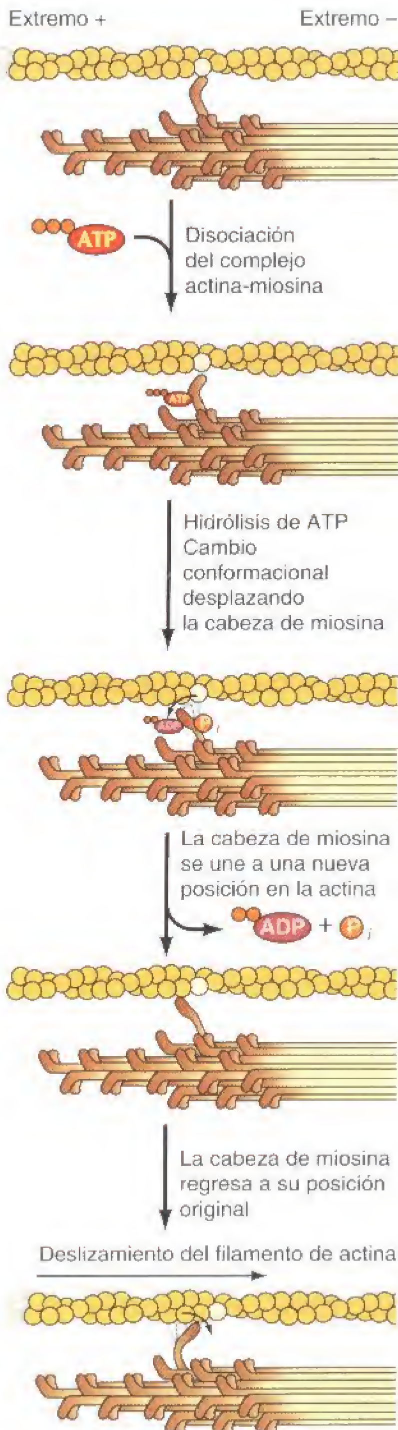



*Figura 11.24*

**Organización de los filamentos gruesos de miosina.** Los filamentos gruesos están constituidos por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina II en una formación escalonada. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los filamentos de miosina y de actina. La orientación de los filamentos de actina y miosina se invierte a partir de la línea M, por lo que su polaridad relativa es igual en ambos lados del sarcómero.




discos Z por sus extremos «más») se invierte a partir de la línea M, por lo que la orientación relativa de los filamentos de actina y miosina es la misma en ambas mitades del sarcómero. Como se verá más adelante, la actividad motora de la miosina mueve sus grupos de cabeza a lo largo del filamento de actina en la dirección del extremo «más». Este movimiento desliza los filamentos de actina desde ambos lados del sarcómero hacia la línea M, lo que acorta el sarcómero y tiene como resultado en la contracción muscular.

Además de unirse a la actina, las cabezas de miosina fijan e hidrolizan ATP, el cual proporciona la energía para dirigir el deslizamiento de los filamentos. Esta transformación de energía química en movimiento se realiza mediante cambios en la forma de la miosina debidos a la unión del ATP. El modelo comúnmente aceptado (el modelo de vaivén o balanceo del puente cruzado) es que la hidrólisis de ATP provoca repetidos ciclos de interacción entre las cabezas de miosina y la actina. Durante cada ciclo, los cambios conformacionales en la miosina conducen al movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

Aunque los mecanismos moleculares no están todavía completamente dilucidados, se ha proporcionado un modelo plausible de la actividad de la miosina a partir de estudios *in vitro* del movimiento de la miosina a lo largo de filamentos de actina (un sistema desarrollado por James Spudich y Michael Sheetz) y a partir de la determinación de la estructura tridimensional de la miosina por Ivan Rayment y sus colaboradores (Fig. 11.25). El ciclo comienza con la miosina (en ausencia de ATP) unida fuertemente a la actina. La unión de ATP disocia el complejo miosina-actina y la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en la miosina. Este cambio afecta a la región del cuello de la miosina que une las cadenas ligeras (véase Fig. 11.23), que actúa como un brazo de palanca desplazando la cabeza de miosina aproximadamente 5 nm. Los productos de la hidrólisis (ADP y $P_i$) permanecen unidos a la cabeza de miosina, diciéndose que está en posición «ladeada». La cabeza de miosina se vuelve a unir al filamento de actina en una nueva posición, produciéndose la liberación de ADP y $P_i$ y disparando el «golpe de potencia», por el cual la cabeza de miosina retorna a su conformación inicial, deslizando de esa manera los filamentos de actina hacia la línea M del sarcómero.

*Figura 11.25*

**Modelo para la actuación de la miosina.** La unión del ATP disocia la miosina de la actina. Entonces la hidrólisis de ATP induce un cambio conformacional que desplaza al grupo de cabeza de la miosina. A esto le sigue la unión de la cabeza de miosina en una nueva posición sobre el filamento de actina y la liberación de ADP y $P_i$. El regreso de la cabeza de miosina a su conformación original dirige el deslizamiento del filamento de actina.

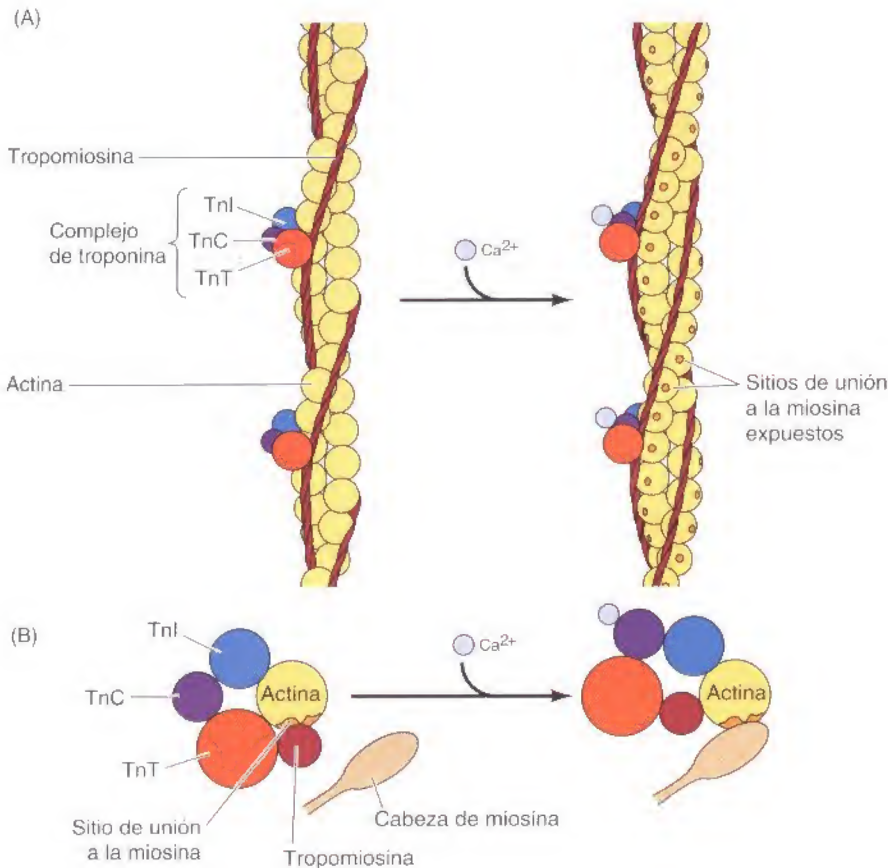



*Figura 11.26*
**Asociación de la tropomiosina y troponinas a los filamentos de actina.** (A) La tropomiosina se une longitudinalmente a lo largo de los filamentos de actina y, en el músculo estriado, se asocia con un complejo de tres troponinas: troponina I (TnI), troponina C (TnC) y troponina T (TnT). En ausencia de $Ca^{2+}$, el complejo de tropomiosina-troponina bloquea la fijación de la miosina a la actina. La unión del $Ca^{2+}$ a la TnC altera la disposición del complejo, retirando la inhibición y permitiendo que la contracción tenga lugar. (B) Vista en sección transversal.

La contracción del músculo esquelético es disparada por impulsos nerviosos que estimulan la liberación de $Ca^{2+}$ desde el **retículo sarcoplásmico** —una red especializada de membranas internas, similar al retículo endoplasmático, que almacena una elevada concentración de iones $Ca^{2+}$—. La liberación del $Ca^{2+}$ desde el retículo sarcoplásmico incrementa la concentración de $Ca^{2+}$ en el citosol desde, aproximadamente, $10^{-7}$ a $10^{-5}$ *M*. El aumento de la concentración de $Ca^{2+}$ es la señal para la contracción muscular, interviniendo dos proteínas accesorias unidas a los filamentos de actina: la **tropomiosina** y la **troponina** (Fig. 11.25). La tropomiosina es una proteína fibrosa que se une a lo largo del surco de los filamentos de actina. En el músculo estriado, cada molécula de tropomiosina se une a la troponina, la cual es un complejo de tres polipéptidos: troponina C (de unión a $Ca^{2+}$), troponina I (inhibidora), y troponina T (de unión a la tropomiosina). Cuando la concentración de $Ca^{2+}$ es baja, el complejo de las troponinas con la tropomiosina bloquea la interacción de la actina y la miosina, por lo que el músculo no se contrae. A altas concentraciones, la unión del $Ca^{2+}$ a la troponina C altera la disposición del complejo, retirando la inhibición y permitiendo que se produzca la contracción.

### *Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares*

En las células no musculares también se encuentran asociaciones contráctiles de actina y miosina, similares a versiones a pequeña escala de las fibras musculares. Al igual que en el músculo, los filamentos de actina en estos ensamblajes contráctiles están intercalados con filamentos bipolares de miosina II, constituidos por 15 a 20 moléculas de miosina II, los cuales producen la contracción

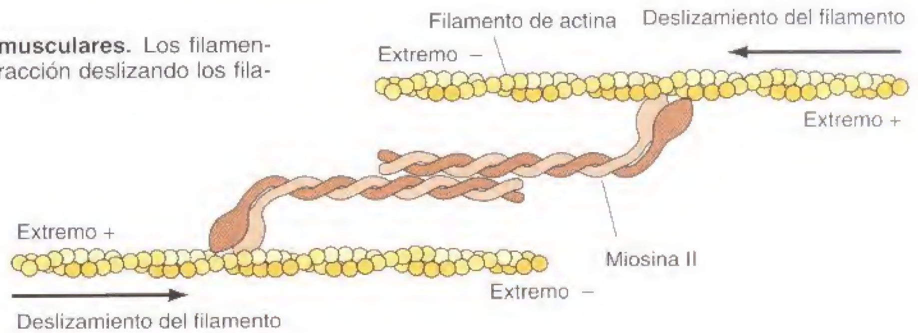



*Figura 11.27*
**Asociaciones contráctiles en células no musculares.** Los filamentos bipolares de miosina II producen la contracción deslizando los filamentos de actina en direcciones opuestas.

deslizando los filamentos de actina uno sobre otro (Fig. 11.27). Los filamentos de actina en los haces contráctiles de las células no musculares también están asociados a la tropomiosina, que facilita su interacción con la miosina II, probablemente en competencia con la filamina por los sitios de unión a la actina.

Dos ejemplos de asociaciones contráctiles en células no musculares, las fibras de estrés y los cinturones de adhesión, fueron tratados anteriormente al hablar de la unión del citoesqueleto de actina a regiones de contacto sustrato-célula y célula-célula (véanse Figs. 11.14 y 11.15). La contracción de las fibras de estrés genera tensión a lo largo de la célula, permitiendo a la célula tirar del sustrato (p. ej., la matriz extracelular) al que está anclada. La contracción de los cinturones de adhesión altera la forma de las capas de las células epiteliales: un proceso que es particularmente importante durante el desarrollo embrionario, cuando las capas de células epiteliales se pliegan para generar estructuras como pueden ser los tubos.

Sin embargo, el ejemplo más notorio de contracción mediada por actina-miosina en células no-musculares lo proporciona la **citocinesis** —la división de una célula en dos tras la mitosis (Fig. 11.28)—. Hacia el final de la mitosis en las células animales, un **anillo contráctil** formado por filamentos de actina y de miosina II se ensambla justo debajo de la membrana plasmática. Al contraerse, tira progresivamente de la membrana plasmática hacia dentro, estrangulando la célula por el centro y dividiéndola en dos. Es interesante señalar que el grosor del anillo contráctil permanece constante según se contrae, lo que implica que los filamentos de actina se desensamblan a medida que avanza la contracción. Tras la división celular el anillo se disgrega por completo.

La regulación de la contracción por actina-miosina en el músculo estriado, vista anteriormente, tiene lugar mediante la unión de $Ca^{2+}$ a la troponina. Sin embargo, en las células no musculares y en el músculo liso la contracción se regula principalmente por la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina, la denominada cadena ligera reguladora (Fig. 11.29). La fosforilación de la cadena ligera reguladora en estas células tiene al menos dos efectos: promueve el ensamblaje de la miosina en filamentos, y aumenta la actividad catalítica de la miosina, permitiendo que la contracción tenga lugar. La enzima que cataliza esta fosforilación, denominada **quinasa de la cadena ligera de la miosina**, está regulada por la asociación con la proteína de unión de $Ca^{2+}$ **calmodulina**. El aumento del $Ca^{2+}$ citosólico promueve la unión de la calmodulina a la quinasa, lo que origina la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina. Por lo tanto, el incremento del $Ca^{2+}$ citosólico es el responsable, aunque indirectamente, de la activación de la miosina en el músculo liso y en las células no musculares, así como en el músculo estriado.

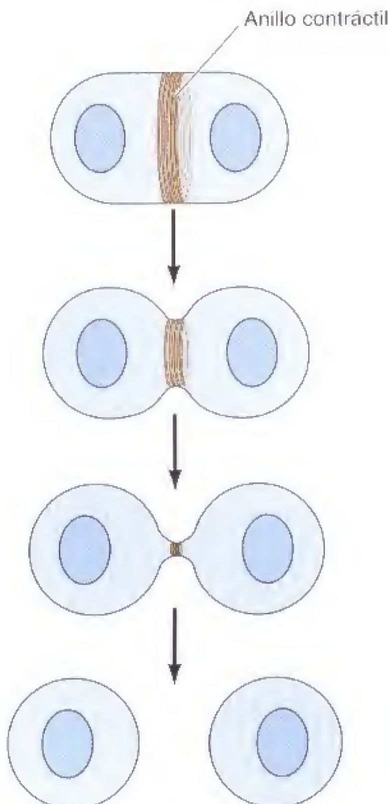



*Figura 11.28*
**Citocinesis.** Tras completarse la mitosis (división nuclear), un anillo contráctil formado por filamentos de actina y miosina II divide la célula en dos.

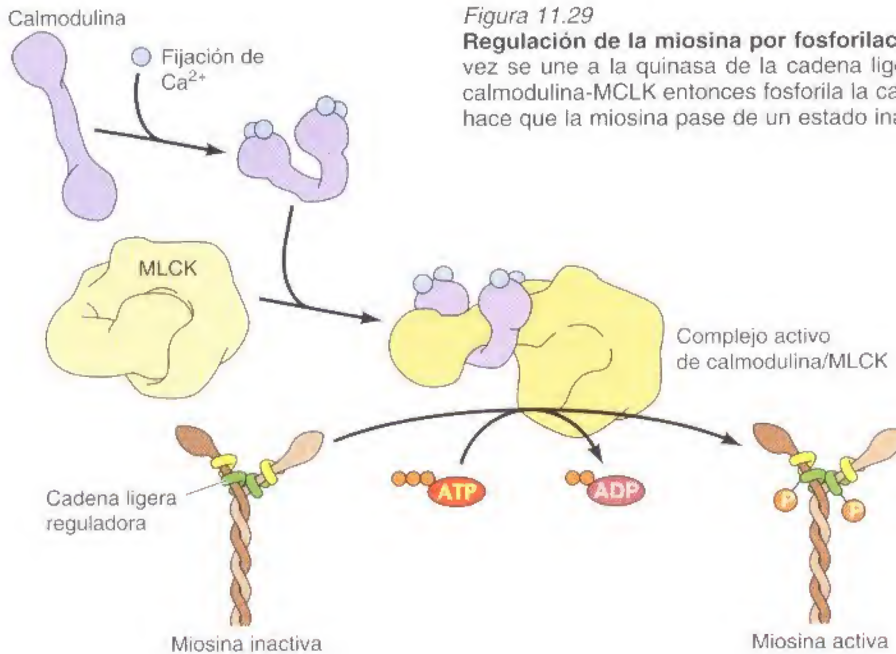



*Figura 11.29*
**Regulación de la miosina por fosforilación.** El $Ca^{2+}$ se fija a la calmodulina, que a su vez se une a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). El complejo activo calmodulina-MCLK entonces fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II, lo que hace que la miosina pase de un estado inactivo a otro activo.

## *Miosinas no convencionales*

Además de la miosina II (miosina «convencional» de dos cabezas), en las células no musculares se encuentran otros tipos de miosinas. A diferencia de la miosina II, estas miosinas «no convencionales» no forman filamentos y por tanto no están implicadas en la contracción. Sin embargo, pueden estar implicadas en otros tipos de movimientos celulares, tales como el transporte de vesículas de membrana y orgánulos a lo largo de los filamentos de actina, la fagocitosis y la extensión de los pseudópodos en las amebas (véase Fig. 11.18).

Las miosinas no convencionales mejor estudiadas son miembros de la familia de la **miosina I** (Fig. 11.30). Las proteínas miosina I contienen un grupo de cabeza globular que actúa como un motor molecular, al igual que en la miosina II. Sin embargo, los miembros de la familia de la miosina I son moléculas mucho más pequeñas (aproximadamente 110 kDa en las células de mamíferos) que carecen de la cola larga de la miosina II y no forman dímeros. Sus colas pueden no obstante unirse a otras estructuras, como a las vesículas de membrana o a orgánulos. El movimiento de la miosina I a lo largo de un filamento de actina puede entonces transportar la carga que lleve unida. Una función de la miosina I, vista anteriormente, es la formación de los brazos laterales que unen a los filamentos de actina con la membrana plasmática de las microvellosidades intestinales (véase Fig. 11.17). En estas estructuras, la actividad motora de la miosina I puede mover la membrana plasmática a lo largo de los haces de actina hacia la punta de la microvellosidad. La miosina I podría intervenir también en el transporte de las vesículas y de los orgánulos a lo largo de los filamentos de actina y en el movimiento de la membrana plasmática durante la fagocitosis y la extensión de pseudópodos.

Además de las miosinas I y II, al menos otras 12 clases de miosinas no convencionales (III hasta XIV) han sido identificadas. Algunas de estas miosinas no convencionales tienen dos cabezas como la miosina II, mientras que otras presentan una cabeza como la miosina I (Fig. 11.31). Las funciones de la mayor parte de estas miosinas no convencionales no se han determinado, pero se ha demostrado claramente que algunas desempeñan un papel importante en el movimiento de los orgánulos (miosinas V y VI) y en funciones sensoriales tales como la visión (miosina III) y la audición (miosinas VI y VII). Además, algunas de estas miosinas participan en la reorganización de filamentos de actina.

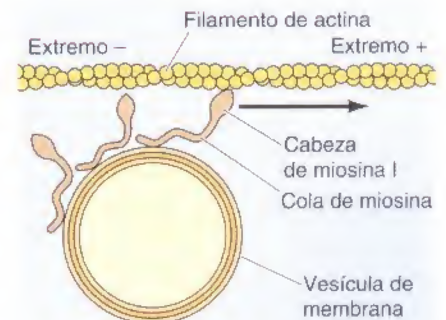



*Figura 11.30*
**Miosina I.** La miosina I contiene un grupo de cabeza similar a la miosina II, pero presenta una cola comparativamente pequeña y no forma dímeros ni filamentos. Aunque no puede inducir la contracción, la miosina I puede trasladarse a lo largo de los filamentos de actina (hacia el extremo «más») portando diversos cargas (como vesículas de membrana) unidas a su cola.

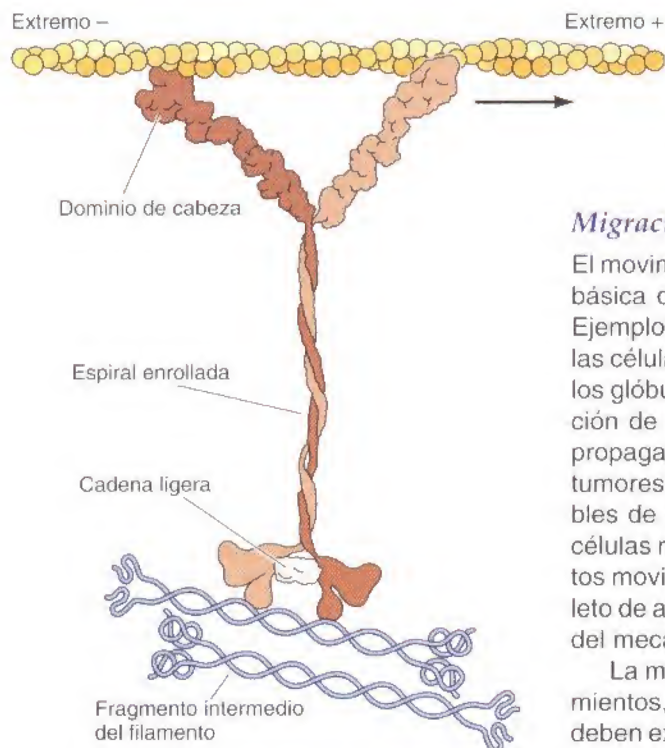



*Figura 11.31*
**Miosina V.** La miosina V es una miosina con dos cabezas como la II. Transporta organelos y otra mercancía (p. ej., filamentos intermedios) hacia los extremos + de los filamentos de actina. El modelo que se muestra está basado en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X. (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112: 467.)

## *Migración y arrastre celular*

El movimiento de las células sobre una superficie representa una forma básica de locomoción celular, empleada por varios tipos de células. Ejemplos de esto son los movimientos de las amebas, la migración de las células embrionarias durante el desarrollo, la invasión de tejidos por los glóbulos blancos sanguíneos para combatir una infección, la migración de las células implicadas en la cicatrización de las heridas y la propagación de las células cancerosas durante la metástasis de los tumores malignos. Movimientos similares son también los responsables de la fagocitosis y de la extensión de las prolongaciones de las células nerviosas durante el desarrollo del sistema nervioso. Todos estos movimientos se basan en las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina, aunque aún no se comprende en su totalidad los detalles del mecanismo.

La migración o arrastre celular implica un ciclo coordinado de movimientos, en el que pueden identificarse tres pasos. En primer lugar, se deben extender protuberancias como pseudópodos, lamelipodios o microespinas (véase Fig. 11.18) desde el borde delantero de la célula (Fig. 11.32). En segundo lugar, estas extensiones deben sujetarse al sustrato por el que la célula migra. Finalmente, el borde posterior de la célula debe disociarse del sustrato y retraerse hacia el cuerpo celular. Una variedad de experimentos indican que la extensión del frente de avance implica la ramificación y polimerización de filamentos de actina. Así, la inhibición de la polimerización de actina (p. ej., mediante el tratamiento con citocalasina) bloquea la formación de prolongaciones de la superficie celular.

El movimiento celular *in vivo* se entiende mejor en la cicatrización de heridas, donde las células del borde de un corte se mueven sobre la matriz extracelular, o las células subyacentes, para cubrir la herida. La regulación de este proceso implica a proteínas GTPasas de bajo peso molecular de la familia Rho, de las que se habla en el Capítulo 13. Las proteínas Rho inician el crecimiento local y la ramificación de los filamentos de actina, activando al complejo Arp2/3 para crear ramas y a la ADF/cofilina para escindir los filamentos preexistentes y permitir nuevo crecimiento a partir de los nuevos extremos positivos. A medida que se extienden los nuevos microfilamentos en la prolongación celular, los microtúbulos reorganizados y los nuevos microfilamentos proporcionan vías para el suministro de vesículas membranosas y proteínas, necesarias para la sucesiva extensión. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas formadoras de haces de actina, necesarias para la formación de haces de actina y fibras de estrés inmediatamente detrás del frente de avance, proteínas de la familia calponina, proteínas como la talina y la vinculina que se encuentran en las adhesiones focales (véase Fig. 11.14) y la cortactina—una proteína asociada a la membrana, que ancla al complejo Arp2/3 a la membrana en el frente de avance. Las proteínas de los filamentos intermedios también son transportadas hacia el

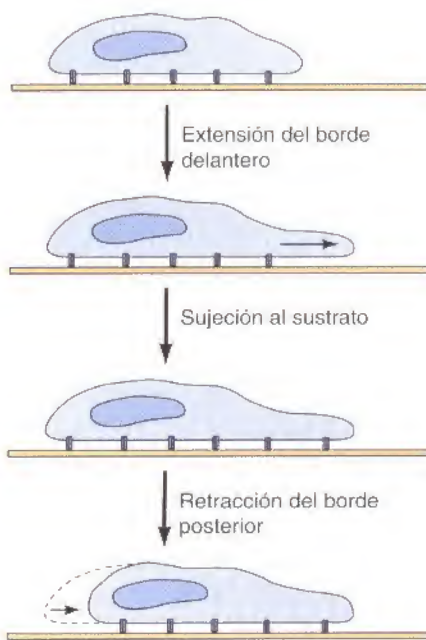



*Figura 11.32*
**Arrastre celular.** El movimiento de arrastre de las células a través de una superficie puede considerarse como tres pasos de un movimiento coordinado: (1) extensión del borde delantero, (2) sujeción de la zona anterior al sustrato y (3) retracción de la parte posterior de la célula hacia el cuerpo celular.

frente de avance, donde son utilizadas para la reorganización de la red de filamentos intermedios. Tanto la quinesina como la miosina funcionan como motores que participan en estos procesos. En las neuronas, la miosina no convencional, miosina V, es necesaria para proporcionar los nuevos componentes de membrana para la extensión de filopodios.

La adhesión celular a la superficie, requiere la reconstrucción de las adhesiones célula-sustrato o célula-célula. Para las células de movimiento lento, como las células epiteliales o los fibroblastos, la adhesión implica la formación de adhesiones focales (véase Fig. 11.14). Las células que se mueven más rápido, como las amebas o los leucocitos, forman contactos más difusos con el sustrato, cuya composición molecular no se conoce. La reconstrucción de las adhesiones focales tiene lugar en dos pasos: la aparición de pequeños complejos focales que contienen algunos microfilamentos unidos a integrinas, y el crecimiento de esos complejos focales para formar contactos focales maduros (ilustrado en la Fig. 11.14). La aparición de contactos focales maduros requiere el desarrollo de tensión entre la célula y el sustrato, la cual se genera mediante la acción de los motores de miosina, sobre los haces de actina o las fibras de estrés.

El estadio final de la migración celular, la retracción del extremo posterior, implica la acción de pequeñas proteínas de unión a GTP de la familia ARF (véase Cap. 9), que degradan las adhesiones focales existentes en el extremo posterior de la célula. La contracción de los haces de actina y las fibras de estrés, conectadas a las nuevas adhesiones focales formadas en el frente de avance, genera entonces la fuerza necesaria para arrastrar el extremo posterior de la célula hacia delante. La necesidad de la miosina II para la retracción del extremo posterior fue demostrada en primer lugar en mutantes de *Dictyostelium* que carecen de miosina II, pero es ahora conocida en todas las células eucariotas.

## Filamentos intermedios

Los **filamentos intermedios** tienen un diámetro de unos 10 nm, el cual es intermedio entre los diámetros de los otros dos elementos principales del citoesqueleto, los filamentos de actina (de unos 7 nm) y los microtúbulos (de unos 25 nm). A diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios no están directamente implicados en los movimientos celulares. Parecen desempeñar básicamente un papel estructural proporcionando resistencia mecánica a las células y tejidos.

### *Proteínas de los filamentos intermedios*

Mientras que los filamentos de actina y los microtúbulos son polímeros constituidos por un solo tipo de proteínas (actina y tubulina, respectivamente), los filamentos intermedios están compuestos por diversas proteínas que se expresan en distintos tipos de células. Más de 50 proteínas diferentes de filamentos intermedios han sido identificadas y clasificadas en seis grupos en función de las similitudes entre sus secuencias de aminoácidos (Tabla 11.1).

**TABLA 11.1.** Proteínas de los filamentos intermedios

| Tipo | Proteína | Tamaño (kD) | Lugar de expresión |
|---|---|---|---|
| I | Queratinas ácidas (~15 proteínas) | 40-60 | Células epiteliales |
| II | Queratinas neutras o básicas (~15 proteínas) | 50-70 | Células epiteliales |
| III | Vimentina | 54 | Fibroblastos, glóbulos blancos sanguíneos y otros tipos de células |
| | Desmina | 53 | Células musculares |
| | Proteína ácida fibrilar glial | 51 | Células gliales |
| | Periferina | 57 | Neuronas periféricas |
| IV | Proteínas de neurofilamentos | | |
| | NF-L | 67 | Neuronas |
| | NF-M | 150 | Neuronas |
| | NF-H | 200 | Neuronas |
| | α-Internexina | 66 | Neuronas |
| V | Láminas nucleares | 60-75 | Lámina nuclear de todo tipo de células |
| VI | Nestina | 200 | Células madre del sistema nervioso central |

Los tipos I y II son dos grupos de **queratinas**, constituidos cada uno por aproximadamente 15 proteínas diferentes, que se expresan en las células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza al menos una queratina de tipo I (ácida) y una de tipo II (neutra/básica), que copolimerizan para formar filamentos. Algunas queratinas de tipo I y II (denominadas **queratinas duras**) son constituyentes de estructuras tales como pelo, uñas y cuernos. Las otras queratinas de tipo I y II (**queratinas blandas**) son abundantes en el citoplasma de las células epiteliales, expresándose queratinas diferentes en los distintos tipos celulares diferenciados.

Las proteínas tipo III de filamentos intermedios incluyen a la **vimentina**, que se encuentra en diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, células de músculo liso y glóbulos blancos sanguíneos. Otra proteína tipo III, la **desmina**, se expresa de manera específica en las células musculares, donde conecta los discos Z de los elementos contráctiles individuales. Una tercera proteína tipo III de filamentos intermedios se expresa de forma específica en las células gliales, y una cuarta en neuronas del sistema nervioso periférico.

Las proteínas tipo IV de filamentos intermedios incluyen a las tres **proteínas de neurofilamentos (NF)** (designadas NF-L, NF-M, y NF-H de *l*ight -ligera-, *m*edium -media-, *h*eavy -pesada-, respectivamente). Estas proteínas forman los filamentos intermedios principales de muchos tipos de neuronas maduras. Abundan principalmente en los axones de las neuronas motoras y se piensa que desempeñan un papel crítico en el sostén de estás prolongaciones largas y delgadas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Otra proteína tipo IV ($\alpha$-internexina) se expresa en una etapa anterior del desarrollo neuronal, previa a la expresión de las proteínas de neurofilamentos. La única proteína tipo VI de filamentos intermedios (nestina) se expresa en una etapa anterior del desarrollo de las neuronas, en las células madre del sistema nervioso central.

Las proteínas tipo V de filamentos intermedios son las láminas nucleares, que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. En vez de ser parte del citoesqueleto, las láminas nucleares son componentes del núcleo, donde se ensamblan para formar una red ortogonal sobre la que se asienta la envuelta nuclear y que se extiende difusamente hacia el interior nuclear (véase Fig. 8.3).

A pesar de la considerable diversidad en el tamaño y en la secuencia de aminoácidos, las diferentes proteínas de filamentos intermedios muestran una organización estructural común (Fig. 11.33). Todas las proteínas de filamentos intermedios tienen un dominio en $\alpha$-hélice como eje central de aproximadamente 310 aminoácidos (350 aminoácidos en las láminas nucleares). Este dominio de eje central está flanqueado por dominios amino- y carboxilo- terminales, que varían entre las diferentes proteínas de filamentos intermedios en tamaño, secuencia y estructura secundaria. Como se tratará a continuación, el dominio central en $\alpha$-hélice juega un papel fundamental en el ensamblaje de los filamentos, mientras que los dominios variables de la cabeza y la cola presumiblemente determinan las funciones específicas de las diferentes proteínas de los filamentos intermedios.

## *Ensamblaje de los filamentos intermedios*

El primer paso en el ensamblaje de los filamentos es la formación de dímeros en los cuales los dominios de eje central de dos cadenas polipeptídicas están enrollados uno alrededor del otro en una estructura de espiral enrollada (*coiled-coil*), similar a la formada por las cadenas pesadas de la miosina II (Fig. 11.34). Los




*Figura 11.33*
**Estructura de las proteínas de filamentos intermedios.** Las proteínas de filamentos intermedios contienen un dominio en $\alpha$-hélice como eje central de, aproximadamente, 310 aminoácidos (350 aminoácidos en las láminas nucleares). El dominio de cabeza N-terminal y el dominio de cola C-terminal varían en tamaño y forma.

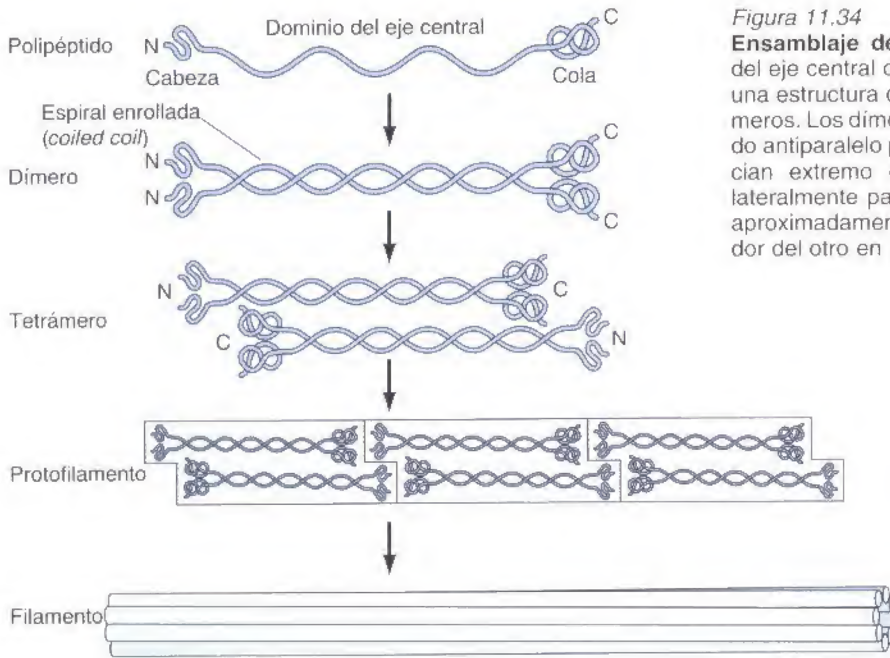



*Figura 11.34*
**Ensamblaje de los filamentos intermedios.** Los dominios del eje central de dos polipéptidos se enrollan uno con otro en una estructura de espiral enrollada (*coiled coil*) para formar dímeros. Los dímeros entonces se asocian de un modo escalonado antiparalelo para formar tetrámeros. Los tetrámeros se asocian extremo con extremo para formar protofilamentos y lateralmente para formar filamentos. Cada filamento contiene aproximadamente ocho protofilamentos enrollados uno alrededor del otro en una estructura a modo de cuerda.

dímeros entonces se asocian de un modo escalonado antiparalelo para formar tetrámeros, que se ensamblan extremo con extremo para formar protofilamentos. El filamento intermedio resultante contiene aproximadamente ocho protofilamentos enrollados uno alrededor del otro en una estructura a modo de cuerda. Debido a que el ensamblaje se produce a partir de tetrámeros antiparalelos, ambos extremos de los filamentos intermedios son equivalentes. Por lo tanto, y a diferencia de los filamentos de actina y de los microtúbulos, los filamentos intermedios son apolares; no tienen diferenciados un extremo «más» y «menos».

El ensamblaje de filamentos requiere interacciones entre los tipos específicos de proteínas de filamentos intermedios. Por ejemplo, los filamentos de queratina siempre se ensamblan a partir de heterodímeros que contienen un polipéptido de tipo I y uno de tipo II. Por el contrario, las proteínas de tipo III pueden ensamblarse en filamentos constituidos por un único polipéptido (p. ej., vimentina) o constituidos por dos proteínas de tipo III diferentes (p. ej., vimentina más desmina). Sin embargo, las proteínas de tipo III no forman copolímeros con las queratinas. Entre las proteínas de tipo IV, la $\alpha$-internexina puede ensamblarse en filamentos consigo misma, mientras que las tres proteínas de neurofilamentos copolimerizan para formar heteropolímeros.

Los filamentos intermedios suelen ser más estables que los filamentos de actina o los microtúbulos y no exhiben el comportamiento dinámico asociado a estos otros elementos del citoesqueleto (p. ej., el intercambio rotatorio de los filamentos de actina que se muestra en la Fig. 11.4). Sin embargo, las proteínas de filamento intermedio suelen ser modificadas por fosforilación, que puede regular su ensamblaje y desensamblaje en la célula. El ejemplo más claro es la fosforilación de las láminas nucleares (véase Fig. 8.31), que da como resultado en el desensamblaje de la lámina nuclear y la disgregación de la envuelta nuclear durante la mitosis. Los filamentos intermedios citoplasmáticos, como la vimentina, también son fosforilados, lo que puede llevar a su desensamblaje y reorganización durante los procesos de división o migración celular.

## *Organización intracelular de los filamentos intermedios*

Los filamentos intermedios forman una elaborada red en el citoplasma de la mayoría de las células, extendiéndose a partir de un anillo que rodea al núcleo

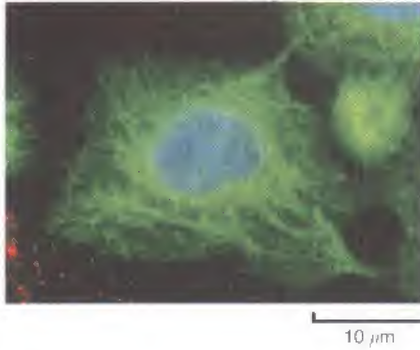


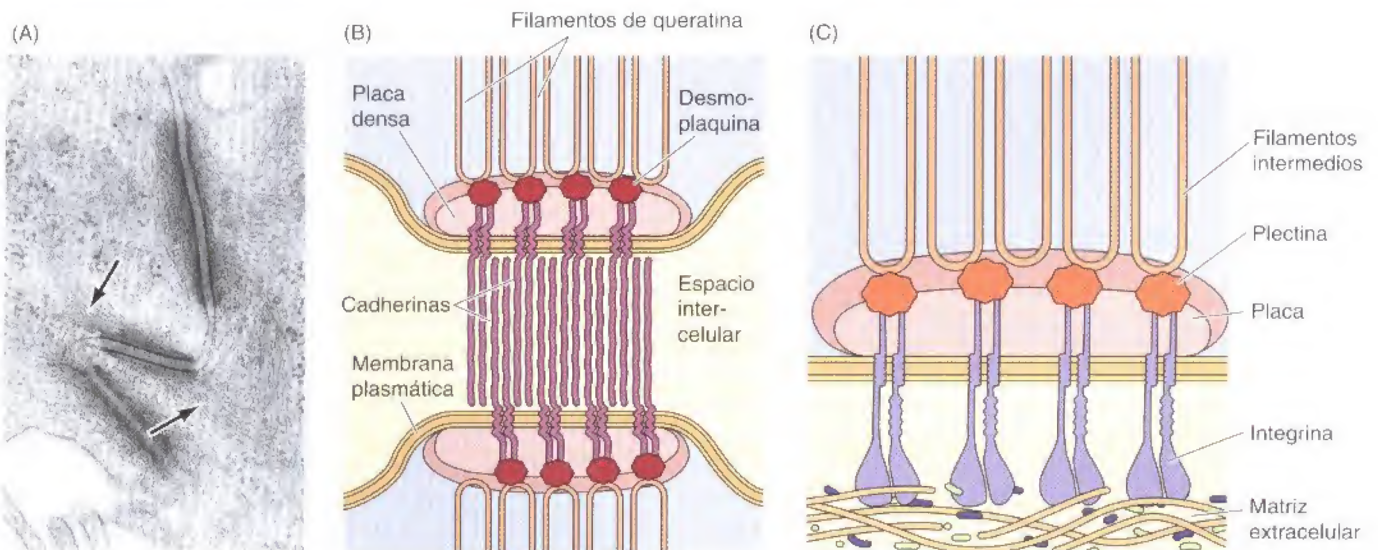

*Figura 11.35*
**Organización intracelular de los filamentos de queratina.** Micrografía de células epiteliales teñidas con anticuerpos fluorescentes contra la queratina (verde). El núcleo se ha teñido de azul. Los filamentos de queratina se extienden a partir de un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática. (Nancy Kedersha/Immunogen/Photo Researchers, Inc.)

hasta la membrana plasmática (Fig. 11.35). Tanto los filamentos de queratina como los de vimentina se fijan a la envuelta nuclear, aparentemente con la función de posicionar y anclar el núcleo dentro de la célula. Además, los filamentos intermedios pueden asociarse no sólo con la membrana plasmática sino también con los otros elementos del citoesqueleto, filamentos de actina y microtúbulos. Por lo tanto, los filamentos intermedios proporcionan un andamiaje que integra a los componentes del citoesqueleto y organiza la estructura interna de la célula.

Los filamentos de queratina de las células epiteliales están fuertemente anclados a la membrana plasmática en dos áreas especializadas de contacto celular, los **desmosomas** y **hemidesmosomas** (Fig. 11.36). Los desmosomas son uniones entre células adyacentes, en las que los contactos célula-célula están mediados por proteínas transmembrana relacionadas con las cadherinas. En su lado citoplasmático, los desmosomas se asocian con una placa densa característica de proteínas intracelulares, a la que se anclan los filamentos de queratina. Estos anclajes están mediados por la desmoplaquina, un miembro de una familia de proteínas denominadas **plaquinas** que unen filamentos intermedios y los vinculan a otras estructuras celulares. Los hemidesmosomas son uniones morfológicamente similares entre las células epiteliales y el tejido conectivo subyacente, en las que los filamentos de queratina se unen a las integrinas a través de otros miembros de la familia de las plaquinas (p. ej., plectina). Por lo tanto, los desmosomas y hemidesmososmas unen los filamentos intermedios a regiones de contacto célula-célula o célula-sustrato, respectivamente, de forma similar a como se une el citoesqueleto de actina a la membrana plasmática en las uniones adherentes y en las adhesiones focales. Es importante destacar que los filamentos de queratina anclados a ambos lados de los desmosomas sirven como un nexo mecánico entre las células adyacentes de una capa epitelial, lo que proporciona estabilidad mecánica a todo el tejido.

Además de unir los filamentos intermedios a las uniones celulares, algunas plaquinas unen los filamentos intermedios a otros elementos del citoesqueleto. La plectina, por ejemplo, se une a filamentos de actina y a microtúbulos además

*Figura 11.36*
**Fijación de los filamentos intermedios a los desmosomas y hemidesmosomas.** (A) Micrografía electrónica mostrando filamentos de queratina (flechas) unidos a placas densas de proteínas intracelulares a ambos lados de un desmosoma. (B) Esquema de un desmosoma. Los filamentos intermedios están anclados a lugares de adhesión célula-célula mediante la desmoplaquina. (C) Esquema de un hemidesmosoma. Los filamentos intermedios están unidos a una integrina por la plectina. (A, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)



de a filamentos intermedios, por lo que puede proporcionar puentes entre estos componentes del citoesqueleto (Fig. 11.37). Se piensa que estos puentes con los filamentos intermedios refuerzan y estabilizan los filamentos de actina y los microtúbulos, lo que incrementa la estabilidad mecánica de la célula.

Dos tipos de filamentos intermedios, la desmina y los neurofilamentos, desempeñan un papel especializado en el músculo y en las células nerviosas, respectivamente. La desmina conecta los ensamblajes individuales de actina-miosina de las células musculares entre sí y a la membrana plasmática, vinculando de esta manera la acción de los elementos contráctiles individuales. Los neurofilamentos son los filamentos intermedios principales en la mayoría de las neuronas maduras. Son particularmente abundantes en los largos axones de las motoneuronas, donde parece que se anclan a los filamentos de actina y a los microtúbulos a través de miembros neuronales de la familia de las plaquinas. Se piensa que los neurofilamentos desempeñan un papel importante en proporcionar soporte mecánico y en estabilizar otros elementos del citoesqueleto en estas extensiones largas y delgadas de las células nerviosas.

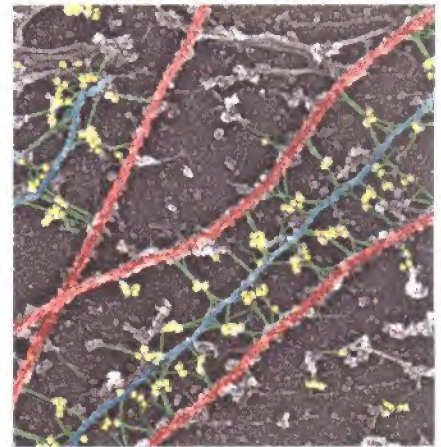


*Figura 11.37*
**Micrografía electrónica de puentes de plectina entre filamentos intermedios y microtúbulos.** Micrografía de un fibroblasto teñido con un anticuerpo contra la plectina. La micrografía ha sido coloreada artificialmente para mostrar la plectina (verde), los anticuerpos contra la plectina (amarillo), los filamentos intermedios (azul) y los microtúbulos (rojo). (Cortesía de Tatyana Svitkina y Gary Borisy, University of Wisconsin/Madison.)

### *Funciones de las queratinas y neurofilamentos: enfermedades de la piel y sistema nervioso*

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que los filamentos intermedios proporcionan un soporte estructural a la célula, sólo recientemente se ha obtenido una evidencia directa de su función. Algunas células en cultivo no fabrican proteínas de filamentos intermedios, lo que indica que estas proteínas no se requieren para el crecimiento de las células *in vitro*. De forma similar, al inyectar anticuerpo contra vimentina en células cultivadas se disgregan las redes de filamentos intermedios sin afectar al crecimiento celular o al movimiento. Por lo tanto, se ha pensado que los filamentos intermedios se necesitan principalmente para fortalecer el citoesqueleto de las células en los tejidos de los organismos multicelulares, donde éstos están sujetos a una gran variedad de tensiones mecánicas que no afectan a las células en el ambiente aislado de una placa de cultivo.

La evidencia experimental de tal papel *in vivo* de los filamentos intermedios se obtuvo por primera vez en 1991 mediante estudios en el laboratorio de Elaine Fuchs. Estos investigadores utilizaron ratones transgénicos para investigar los efectos *in vivo* de la expresión de un mutante de deleción de queratina, que codificaba un polipéptido incompleto que imposibilitaba que se formaran filamentos normales de queratina (Fig. 11.38). Este gen mutado de queratina se

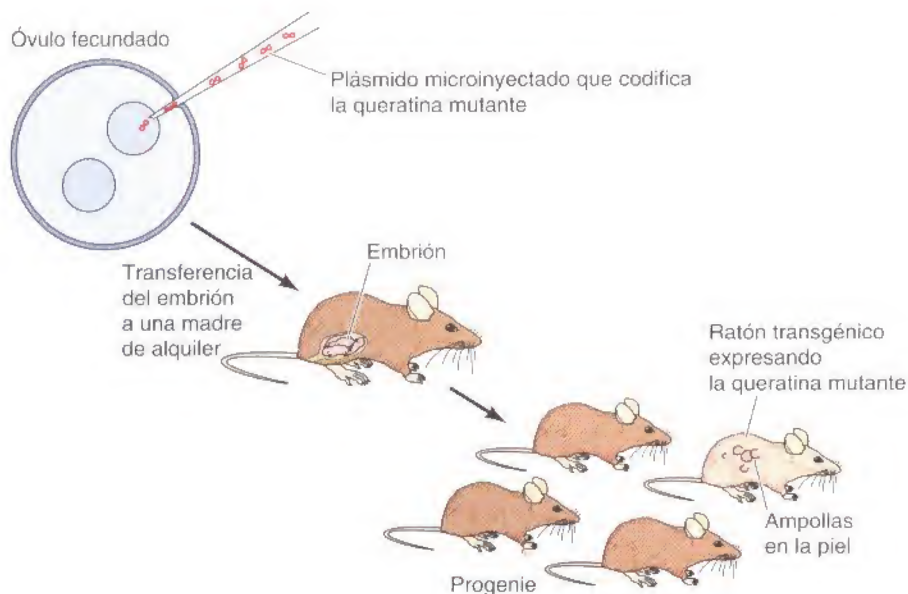
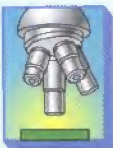



*Figura 11.38*
**Demostración experimental de la función de la queratina.** Un plásmido que codifica una queratina mutante que interfiere en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina se microinyectó dentro de un pronúcleo de un huevo fecundado. El embrión microinyectado fue entonces transferido a una madre de alquiler, y algunos miembros de la descendencia incorporaron el gen de la queratina mutante en su genoma. La expresión del gen mutado en estos ratones transgénicos alteró el citoesqueleto de queratina de las células de la epidermis, dando lugar a la aparición de graves ampollas en la piel debido a lisis celular tras una tensión mecánica suave.



Experimento clave

## La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo de la piel

**La expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos causa serias anomalías semejantes a una enfermedad genética humana de la piel.**
Robert Vassar, Pierre A. Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers y Elaine Fuchs

Universidad de Chicago
*Cell, 1991, Volumen 64, págs. 365-380*



Elaine Fuchs

### Contexto

En 1991, los filamentos intermedios de las células epiteliales eran bien conocidos y se estaba estudiando la aparición, a lo largo del desarrollo, de diferentes formas de queratinas de tipo I y tipo II en la piel. Lo que permanecía desconocido para cualquier filamento intermedio era su función. Mientras que todas las células de los vertebrados contienen filamentos intermedios, las líneas celulares que carecen de ellos sobreviven en cultivo y siguen proliferando. Así, cualquiera que fuese su función, no eran importantes para las células en cultivo, aunque quizás sí para las células en el interior de los tejidos de organismos multicelulares.

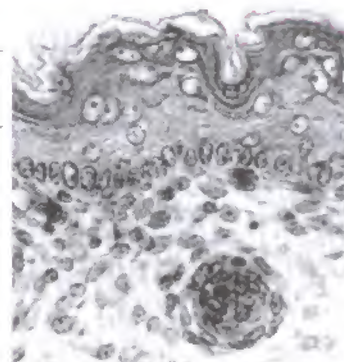
Fuchs y sus colaboradores sabían que durante el desarrollo temprano, el epitelio de la piel expresaba queratina 5 (de tipo I) y queratina 14 (de tipo II). Puesto que las queratinas polimerizan como heterodímeros, se creía que la expresión de una proteína anómala podía interferir con la formación de los filamentos intermedios normales. Fuchs y sus colaboradores inicialmente estudiaron esta posibilidad en células de la piel en cultivo, y demostraron que la expresión de una queratina 14 truncada, interfería con la formación de los filamentos de queratina. Esto sugería que la expresión similar de una queratina mutante en ratones transgénicos, podría causar un defecto en la red de filamentos intermedios de las células de la piel de un embrión. Si esto ocurría, proporcionaría una prueba del papel de los filamentos intermedios en el tejido intacto.

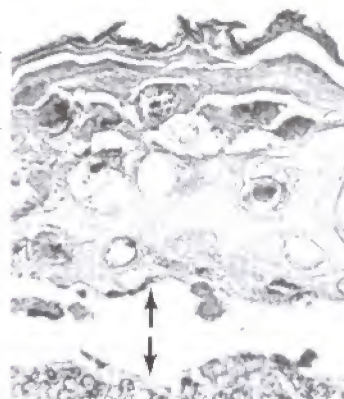
En los experimentos aquí descritos, Fuchs y sus colaboradores demostraron que la expresión de una queratina mutante en ratones transgénicos, no sólo alteraba la red de los filamentos intermedios en las células de la piel, sino que también desencadenaba defectos severos en la organización y estabilidad del tejido de la piel. Así, estos experimentos proporcionaron la primera demostración de un papel fisiológico para los filamentos intermedios.

### Experimentos

Para sus primeros experimentos en células en cultivo, Fuchs y colaboradores construyeron un gen de queratina 14 mutante, en el que se expresaba una proteína truncada que carecía del 30% de la región central del dominio $\alpha$-hélice y de toda la cola carboxilo terminal, a partir del promotor normal de la queratina. Para investigar el papel de la queratina 14 en el desarrollo temprano del ratón, introdujeron el plásmido que codificaba esta queratina 14 mutante en óvulos fertilizados de ratón, que se transfirieron a madres adoptivas y se permitió el desarrollo de la descendencia. Toda la descendencia fue analizada para la queratina 14, y algunos eran transgénicos y expresaban la queratina 14 mutante.

La mayoría de los animales transgénicos murieron en las 24 horas siguientes al nacimiento. Aquellos que sobrevivieron más tiempo mostraron anomalías





Piel de un ratón normal y uno transgénico. (Arriba) Piel de un ratón normal que muestra las capas externas altamente organizadas (corchetes) sin espacios intermedios entre el tejido intacto subyacente. (Abajo) Piel de un ratón transgénico que muestra una severa desorganización de las capas externas, que contienen espacios debido a la abrasión por traumatismos mecánicos y se encuentran separadas del tejido subyacente (flechas).

### *La expresión de una queratina mutante causa un desarrollo anómalo de la piel* (continuación)

severas de la piel, incluyendo ampollas debido a la lisis de células epidérmicas después de traumas mecánicos leves, como el rozamiento de la piel. El análisis mediante tinción de secciones de tejido de la piel de los animales trangénicos, demostró la severa desorganización de la epidermis de los animales más afectados (v´ease figura) y zonas de tejido desorganizado en el resto. La expresión por zonas, es característica de un animal mosaico donde parte del tejido se desarrolla a partir de células embrionarias normales y otra a partir de células que portan el transgén. Analizando la expresión de la proteína mutante, encontraron que las áreas de tejido desorganizado se correlacionaban con la expresión de la queratina 14 mutante. Adicionalmente, existía una clara correlación entre la cantidad de epidermis desorganizada y la susceptibilidad de sufrir lesiones de la piel y la muerte durante el trauma del nacimiento.

Fuchs y sus colaboradores observaron además, que el patrón de desorganización tisular en los ratones transgénicos, se parecía al observado en un grupo de enfermedades cutáneas humanas denominadas epidermolisis bullosa simplex. Así, compararon secciones de tejido de ratones transgénicos, con secciones obtenidas de la piel de un paciente humano, y encontraron patrones muy similares de alteración tisular. A partir de estas observaciones, Fuchs y sus colaboradores concluyeron que los defectos en las queratinas o proteínas de los filamentos intermedios, podían ser una causa de enfermedades genéticas humanas de la piel.

#### *Impacto*

Las anomalías de la piel de estos ratones transgénicos proporcionaron la primera prueba directa del presunto papel de las queratinas, como fuentes de fuerza mecánica para las células epiteliales en los tejidos.

Actualmente, se sabe que el citoesqueleto de los filamentos intermedios es crítico para la estructura de los tejidos como la piel, intestino, corazón, y el músculo esquelético, que están sujetos a estrés mecánico. Por el contrario, los eucariotas unicelulares como las levaduras y muchos pequeños invertebrados, sobreviven perfectamente en ausencia de filamentos intermedios, a menudo modificando el citoesqueleto de actina o de tubulina para que cumpla un papel estructural. Los resultados de Fuchs y sus colaboradores también sugirieron una base para varias enfermedades humanas. De hecho, existen ahora más de diecisiete queratinas diferentes cuya defectuosidad se asocia con enfermedades humanas; estas incluyen tanto a la queratina 4 como a la queratina 14, inicialmente estudiadas en ratones transgénicos.

introdujo en los ratones transgénicos, donde fue expresado en las células basales de la epidermis e impedía la formación de un citoesqueleto de queratina normal. Este hecho desembocó en el desarrollo de alteraciones graves en la piel, incluyendo ampollas debido a lisis celular epidérmica tras un trauma mecánico suave, tal como frotarse la piel. De esta forma las alteraciones de la piel de estos ratones transgénicos supusieron un apoyo directo al supuesto papel de las queratinas en proporcionar resistencia mecánica a las células epiteliales de los tejidos. Posteriormente, se obtuvo el mismo resultado en ratones en los que el gen para la misma queratina estaba inactivado por recombinación homóloga.

Estos experimentos también apuntaron a la base molecular de una enfermedad genética humana, la epidermolisis bullosa simple (EBS). Al igual que los ratones transgénicos que expresan los genes de queratina mutante, los pacientes con esta enfermedad desarrollan ampollas en la piel como consecuencia de una lisis celular después de un trauma leve. Esta similitud condujo a realizar estudios de los genes de la queratina en los pacientes EBS, que demostraron que la EBS está causada por mutaciones en el gen de la queratina que interfieren en el ensamblaje normal de los filamentos de queratina. De esta forma, tanto los estudios experimentales en ratones transgénicos como el análisis molecular de una enfermedad genética humana han demostrado el papel de las queratinas en permitir soportar tensiones mecánicas a las células de la piel. Estudios posteriores han mostrado que las mutaciones en otras queratinas son responsables de otras enfermedades congénitas de la piel, que se caracterizan de forma similar por una fragilidad anormal en las células epidérmicas.

Otros estudios en ratones transgénicos han implicado a neurofilamentos alterados en enfermedades de las neuronas motoras, particularmente en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA, conocida como enfermedad de Lou Gehrig y como la enfermedad que afecta al renombrado físico Stephen Haw-

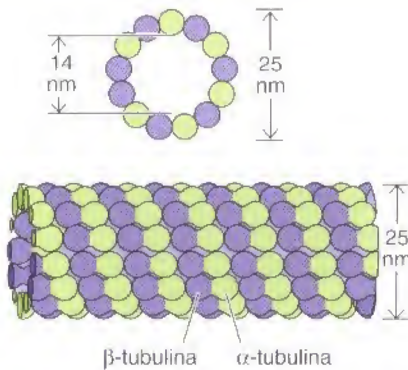



*Figura 11.39*
**Estructura de los microtúbulos.** Los dímeros de α- y de β-tubulina polimerizan para formar microtúbulos, que están constituidos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un corazón hueco.

king, resulta de una pérdida progresiva de las neuronas motoras, que a su vez conduce a una atrofia muscular, parálisis, y posterior muerte. La ELA y otros tipos de enfermedades de las motoneuronas se caracterizan por la acumulación y ensamblaje anormal de los neurofilamentos, lo que sugiere que las alteraciones en los neurofilamentos podrían contribuir a estas patologías. De acuerdo con esta posibilidad, se ha hallado que la sobreexpresión de NF-L o de NF-H en ratones transgénicos da lugar al desarrollo de un estado similar a la ELA. Aunque aun no se comprenden los mecanismos implicados, estos experimentos sugieren claramente que los neurofilamentos intervienen en la patogénesis de las enfermedades de las neuronas motoras.

## Microtúbulos

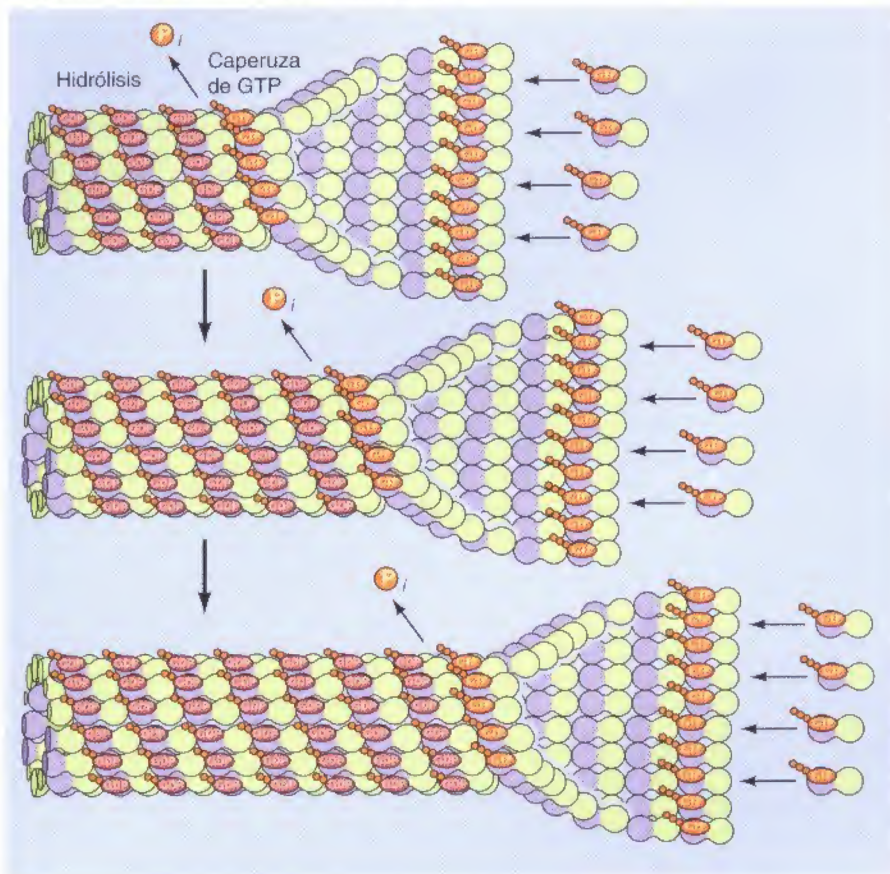
Los **microtúbulos**, el tercer componente principal del citoesqueleto, son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro. Al igual que los filamentos de actina, los microtúbulos son estructuras dinámicas que están continuamente ensamblándose y desensamblándose en la célula. Intervienen en la determinación de la forma celular y en diversos movimientos celulares, incluyendo algunas formas de locomoción celular, el transporte intracelular de orgánulos, y la separación de los cromosomas durante la mitosis.

### *Estructura, ensamblaje e inestabilidad dinámica de los microtúbulos*

A diferencia de los filamentos intermedios, que se componen de diversas proteínas fibrosas, los microtúbulos se componen de un único tipo de proteína globular, denominada **tubulina**. La tubulina es un dímero constituido por dos polipéptidos de 55 kDa estrechamente relacionados, α-tubulina y β-tubulina. Al igual que en la actina, tanto la α-tubulina como la β-tubulina se codifican por pequeñas familias de genes relacionados. Además, un tercer tipo de tubulina (γ-tubulina) se localiza específicamente en el centrosoma, donde desempeña un papel clave en el inicio del ensamblaje de los microtúbulos (como se verá después). El progenitor evolutivo de todas estas tubulinas parece ser una proteína similar a la proteína procariota, FtsZ.

Los dímeros de tubulina polimerizan para formar microtúbulos, que generalmente consisten en 13 protofilamentos lineares ensamblados alrededor de un centro hueco (Fig. 11.39). Los protofilamentos, que están constituidos por un conjunto de dímeros de tubulina dispuestos cabeza con cola, se disponen en paralelo. Como consecuencia, los microtúbulos (al igual que los filamentos de actina) son estructuras polares con dos extremos diferenciados: un extremo «más» de crecimiento rápido y un extremo «menos» de crecimiento lento. Esta polaridad es un dato importante para determinar la dirección del movimiento a lo largo de los microtúbulos, al igual que la polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina.

Los dímeros de tubulina pueden despolimerizar al igual que polimerizar, y los microtúbulos pueden sufrir ciclos de ensamblaje y desensamblaje rápidos. Tanto la α-tubulina como la β-tubulina se unen a GTP, que actúa de forma análoga al ATP fijado a la actina para regular la polimerización. Concretamente, el GTP unido a la β-tubulina (no así el GTP fijado a α-tubulina) se hidroliza a GDP durante o justo después de la polimerización. Esta hidrólisis de GTP disminuye la afinidad de la tubulina por las moléculas adyacentes, lo que favorece la despolimerización y tiene como resultado el comportamiento dinámico de los microtúbulos. Al igual que los filamentos de actina (véase Fig. 11.4), los microtúbulos sufren intercambio rotatorio, un comportamiento dinámico en el que las moléculas de tubulina unidas a GTP se liberan continuamente del extremo «menos» y son reemplazadas por la adición de moléculas de tubulina unida a GTP al extremo «más» del mismo microtúbulo. En los microtúbulos, la hidrólisis de GTP también conduce a un comportamiento que se conoce como **inestabilidad diná-**



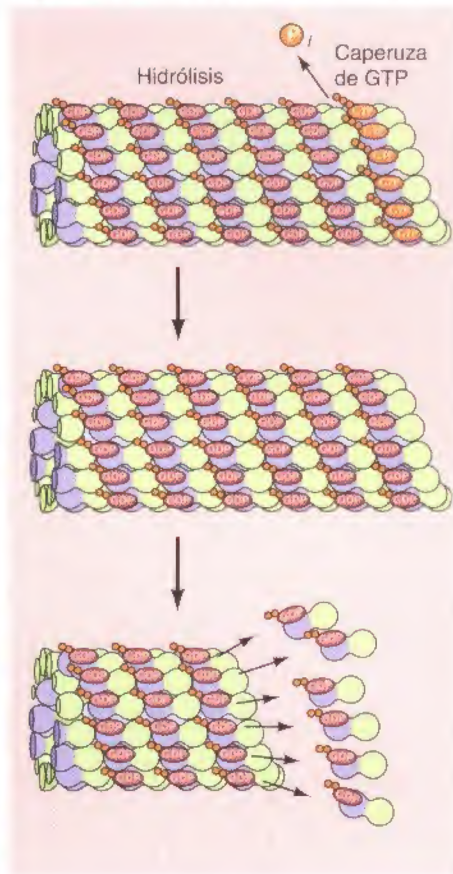




*Figura 11.40*
**Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.** Los dímeros de tubulina polimerizan en los extremos + de un microtúbulo en una capa plana que después se fusiona en el microtúbulo maduro justo por detrás dela región de crecimiento. La inestabilidad dinámica se debe a la hidrólisis del GTP unido a β-tubulina durante o justo después de la polimerización, que reduce la afinidad por las moléculas adyacentes. El crecimiento de los microtúbulos continúa mientras exista una concentración elevada de tubulina unida a GTP. En este caso las moléculas nuevas de tubulina unidas a GTP se añaden más rápido de lo que el GTP es hidrolizado, por lo que se mantiene una caperuza de GTP en el extremo en crecimiento. Sin embargo, si el GTP se hidroliza más rápidamente de lo que se añaden las nuevas subunidades, la presencia de tubulina unida a GDP en el extremo del microtúbulo lleva al desensamblaje y al acortamiento. Solamente se muestran los extremos «más»de los microtúbulos.

**mica**, en el que los microtúbulos individuales alternan entre ciclos de crecimiento y de acortamiento (Fig. 11.40). El que un microtúbulo crezca o se acorte viene determinado por la velocidad de adición de la tubulina respecto a la velocidad de hidrólisis del GTP. Mientras las nuevas moléculas de tubulina unidas a GTP se añadan a mayor velocidad que la de hidrólisis del GTP, el microtúbulo mantiene una caperuza de GTP en su extremo «más» y el crecimiento del microtúbulo continúa. Sin embargo, si la velocidad de polimerización decrece, el GTP fijado a la tubulina en el extremo «más» del microtúbulo será hidrolizado a GDP. Si esto ocurre, la tubulina unida a GDP se disociará, dando lugar a una rápida despolimerización y acortamiento del microtúbulo.

La inestabilidad dinámica, descrita por Tim Mitchison y Marc Kirschner en 1984, da lugar a una renovación continua y rápida de la mayor parte de los microtúbulos, que presentan una vida media en la célula de sólo varios minutos. Como se verá más adelante, esta rápida renovación de los microtúbulos es especialmente importante para el remodelado del citoesqueleto que tiene lugar durante la mitosis. Debido al papel central de los microtúbulos en la mitosis, los fármacos que afectan al ensamblaje de los microtúbulos no sólo son útiles como herramientas experimentales en biología celular sino también en el tratamiento del cáncer. La **colchicina** y la **colcemida** son ejemplos de fármacos experimentales empleados comúnmente que se unen a la tubulina e inhiben la polimerización del microtúbulo, bloqueando de esta forma la mitosis. Dos fármacos relacionados (**vincristina** y **vimblastina**) se usan en la quimioterapia del cáncer debido a que inhiben de forma selectiva a las células en rápida división. Otro fármaco utilizado, el **taxol**, estabiliza los microtúbulos en vez de inhibir su ensamblaje. Dicha estabilización también bloquea la división celular, y el taxol se utiliza como agente anticanceroso y como herramienta experimental.

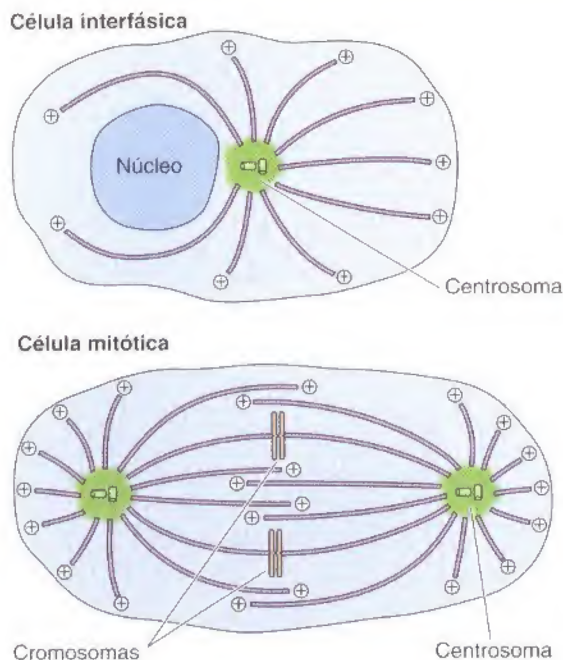


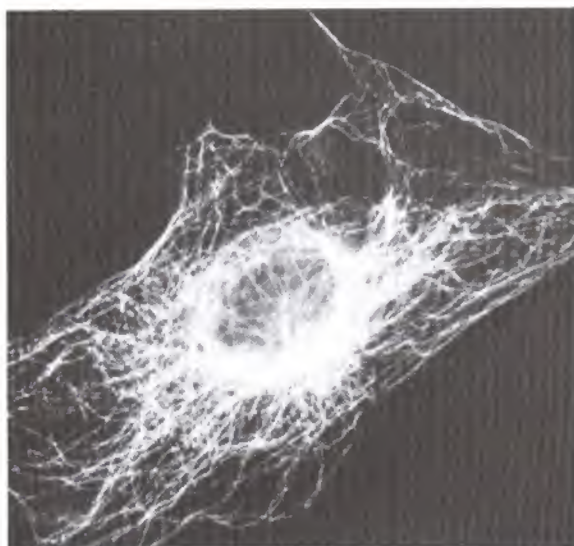

*Figura 11.41*
**Organización intracelular de los microtúbulos.** Los extremos «menos» de los microtúbulos se anclan al centrosoma. En las células interfásicas, el centrosoma se localiza cerca del núcleo y los microtúbulos se extienden hacia la periferia celular. Durante la mitosis los centrosomas duplicados se separan y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico.

## *Centrosoma, centríolos y organización de los microtúbulos*

En la mayoría de las células los microtúbulos se extienden a partir de un **centro organizador de los microtúbulos**, al que se anclan los extremos «menos» de los microtúbulos. En las células animales, el principal centro organizador de los microtúbulos es el **centrosoma** (descrito por primera vez por Theodore Boveri en 1888), que se localiza junto al núcleo cerca del centro de las células interfásicas (no están en división) (Fig. 11.41). Durante la mitosis, de forma similar, los microtúbulos se extienden a partir de centrosomas duplicados para formar el huso mitótico, que es responsable de la segregación y distribución de los cromosomas a las células hijas. De esta manera, el centrosoma desempeña un papel clave en la organización intracelular de los microtúbulos, aunque la mayor parte de los detalles de su actuación continúan siendo un misterio.

El centrosoma sirve como lugar de inicio del ensamblaje de los microtúbulos, que crecerán a partir del centrosoma hacia la periferia de la célula. Esto se puede observar claramente en células que hayan sido tratadas con colcemida para desensamblar sus microtúbulos (Fig. 11.42). Cuando el fármaco se retira, las células se recuperan y pueden verse nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. Es importante señalar que el inicio del crecimiento de los microtúbulos en el centrosoma establece la polaridad de los microtúbulos en la célula. Concretamente, los microtúbulos crecen por la adición de tubulina a sus extremos «más», que se extienden desde el centrosoma hacia la periferia celular. La proteína clave en el centrosoma que nuclea el ensamblaje de microtúbulos en la $\gamma$-tubulina, una especie menor de tubulina identificada en primer lugar en hongos. Algunos tipos celulares pueden iniciar microtúbulos en ausencia de un centrosoma; se cree que esto se debe a que poseen $\gamma$-tubulina en el citosol. Adicionalmente, las células en interfase o aquellas que no se dividen, como las células epiteliales o nerviosas, a menudo liberan sus microtúbulos del centrosoma para que funcionen en otro lugar de la célula.

(A)

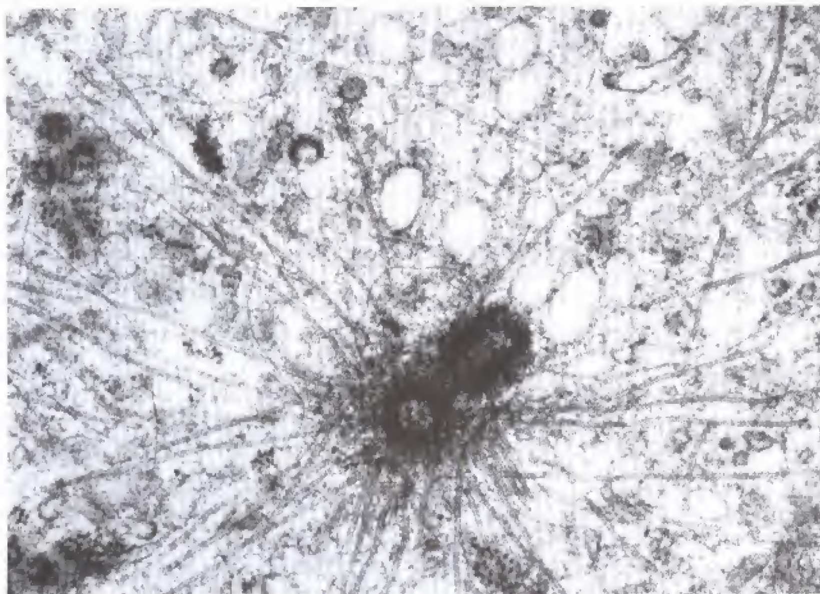


(B)




*Figura 11.42*
**Crecimiento de los microtúbulos desde el centrosoma.** Los microtúbulos en los fibroblastos de ratón se observan mediante microscopía de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo frente a tubulina. (A) La distribución de los microtúbulos en una célula interfásica normal. (B) Esta célula se trató con colcemida durante una hora para desensamblar los microtúbulos. El fármaco fue entonces retirado y se dejó a la célula recuperarse durante treinta minutos, lo que permitió ver nuevos microtúbulos creciendo desde el centrosoma. (De M. Osborn y K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:867.*)

(A)



(B)

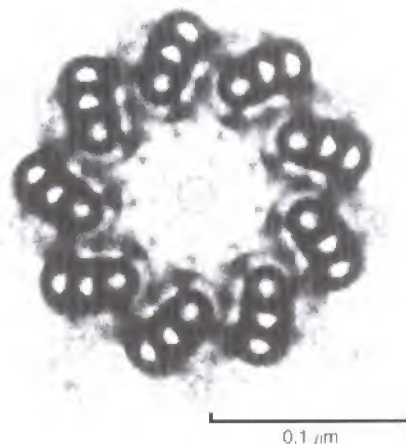



*Figura 11.43*
**Estructura de los centrosomas.** (A) Micrografía electrónica de un centrosoma, mostrando los microtúbulos irradiando desde el material pericentriolar que rodea al par de centríolos. (B) Sección transversal de un centríolo mostrando sus nueve tripletes de microtúbulos. (A, © Cytographics; B, Don Fawcett, Photo Researchers, Inc.)

Los centrosomas de la mayoría de las células animales están constituidos por un par de **centríolos**, orientados perpendicularmente entre sí, rodeados por un **material pericentriolar** amorfo (Fig. 11.43). Los centríolos son estructuras cilíndricas constituidas por nueve tripletes de microtúbulos, de manera similar a los cuerpos basales de los cilios y los flagelos (como se verá después en este mismo Capítulo). Aunque los centríolos probablemente sean los precursores de los cuerpos basales, parece ser que no son indispensables para el funcionamiento del centrosoma. Los centríolos no parecen ser necesarios para el ensamblaje o la organización de los microtúbulos, y no se encuentran en las células vegetales, en muchos eucariotas unicelulares, y en algunas células animales (como en los óvulos de ratón). Los microtúbulos que emanan desde el centrosoma terminan en el material pericentriolar, no en los centríolos, y es el material pericentriolar el que inicia el montaje de los microtúbulos. Sin embargo, la eliminación de los centríolos de las células animales resulta en la dispersión de los contenidos del centrosoma y un declive de la tasa de renovación de los microtúbulos.

Los centriolos son estructuras complejas con una clara polaridad, una estructura proteica con forma de rueda de carro en un extremo y numerosas extensiones hacia el interior del centrosoma (Fig. 11.44). Se cree que las exten-

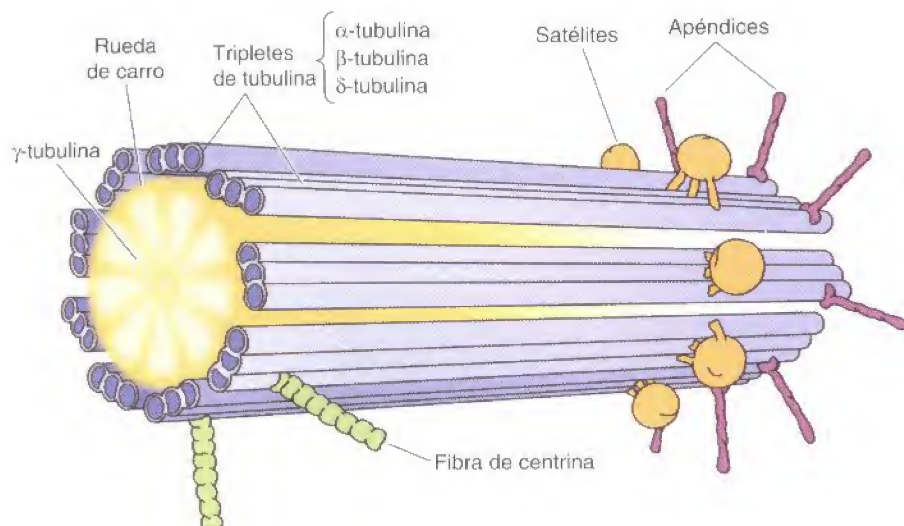



*Figura 11.44*
**Estructura de un centríolo.** Los centríolos son estructuras altamente polares con una estructura proteica en forma de rueda de carro en un extremo y varios tipos de prolongaciones que se extienden desde el otro extremo. Se cree que estas prolongaciones (denominadas satélites y apéndices) interaccionan con proteínas específicas en la matriz del centrosoma. Otras proteínas de la matriz del centrosoma como la γ-tubulina están asociadas con el lumen del centriolo. El triplete de microtúbulos contiene α- y β-tubulinas altamente modificadas y la exclusiva δ-tubulina. Las fibras de centrina se extienden desde los microtúbulos del triplete y se conectan con el otro centríolo. (Modificado a partir de W. F. Marshall, 2001. *Curr. Biol.* 11: R487.)




*Figura 11.45*
**Micrografía electrónica del huso mitótico.** Los microtúbulos del huso se unen a los cromosomas condensados en la metafase. (De C.L. Rieder y S.S. Bowser, 1985. *J. Histochem. Cytochem.* 33:165/ Biological Photo Service.)

siones ayudan a organizar la matriz del centrosoma. Los centríolos también contienen varias proteínas únicas, incluyendo la δ-tubulina, que forma parte de un triplete característico de microtúbulos. Durante la interfase, ambos centríolos están conectados por una o más fibras que contienen centrina (una proteína que une $Ca^{2+}$ relacionada con la calmodulina).

## *Reorganización de los microtúbulos durante la mitosis*

Como ya se comentó, los microtúbulos se reorganizan completamente durante la mitosis, lo que proporciona un claro ejemplo de la importancia de su inestabilidad dinámica. El conjunto de microtúbulos presente en las células interfásicas se disgrega y las subunidades libres de tubulina se reensamblan para formar el **huso mitótico**, responsable de la segregación de los cromosomas hijos (Fig. 11.45). Esta reestructuración del citoesqueleto de microtúbulos es dirigida por la duplicación del centrosoma para formar dos centros organizadores de microtúbulos, separados en polos opuestos del huso mitótico.

Los centríolos y otros componentes del centrosoma se duplican en las células interfásicas, pero permanecen juntos a un lado del núcleo hasta el comienzo de la mitosis (Fig. 11.46). Entonces se separan los dos centrosomas y migran a lados opuestos del núcleo, formando los dos polos del huso mitótico. A medida que la célula entra en mitosis, la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos también cambia drásticamente. Primero, la velocidad de desensamblaje de los microtúbulos aumenta cerca de diez veces, lo que origina una despolimerización general y un acortamiento de los microtúbulos. A su vez, el número de microtúbulos que emana desde el centrosoma aumenta entre cinco y diez veces. En suma, estos cambios producen el desensamblaje de los microtúbulos interfásicos y el crecimiento de un gran número de microtúbulos cortos a partir de los centrosomas.

Como propusieron por primera vez Marc Kirschner y Tim Mitchison en 1986, la formación del huso mitótico implica la estabilización selectiva de algunos de los microtúbulos que irradian desde el centrosoma. Estos microtúbulos son de tres tipos, dos de los cuales componen el huso mitótico. Los **microtúbulos cinetocóricos** se unen a los cromosomas condensados de las células mitóticas en sus centrómeros, que están asociados con proteínas específicas para formar el cinetocoro (véase Fig. 4.19). La fijación al cinetocoro estabiliza a estos microtúbulos, los cuales, como se verá después, desempeñan un papel crítico

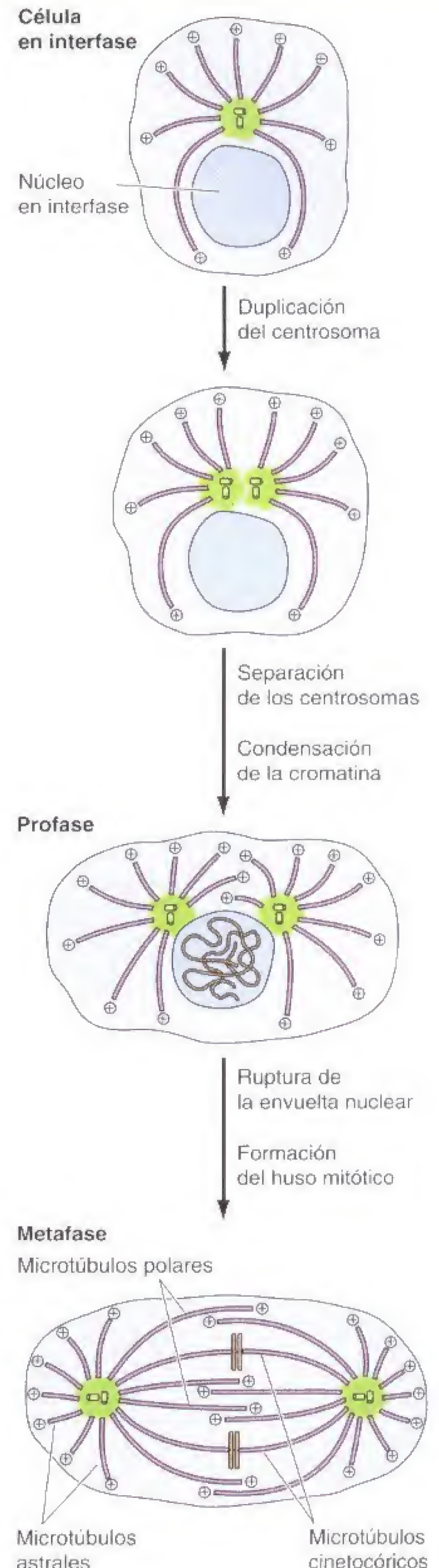



*Figura 11.46*
**Formación del huso mitótico.** Los centríolos y los centrosomas se duplican durante la interfase. Durante la profase de la mitosis, los centrosomas duplicados se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Entonces la envuelta nuclear se desintegra y los microtúbulos se reorganizan para formar el huso mitótico. Los microtúbulos cinetocóricos se unen a los cromosomas condensados, los microtúbulos polares se solapan unos con otros en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales se extienden hacia la periferia de la célula. En la metafase, los cromosomas condensados se alinean en el centro del huso.

en la segregación de los cromosomas mitóticos. El segundo tipo de microtúbulos que se encuentran en el huso mitótico (**microtúbulos polares**) no se unen a los cromosomas. Por el contrario, los microtúbulos polares que emanan desde los dos centrosomas se estabilizan al solaparse uno sobre otro en el centro de la célula. Los **microtúbulos astrales** se extienden desde los centrosomas hacia la periferia de la célula con sus extremos «más» libres. Como se tratará posteriormente, tanto los microtúbulos astrales como los polares contribuyen también al movimiento de los cromosomas al separar los polos del huso.

Según transcurre la mitosis, los cromosomas condensados primero se alinean en la placa metafásica y luego se separan, tirando de las dos cromátidas de cada cromosoma hacia polos opuestos del huso. Proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del huso intervienen en el movimiento de los cromosomas, como se describe a continuación. En la etapa final de la mitosis se vuelve a formar la envuelta nuclear, los cromosomas se descondensan, y tiene lugar la citocinesis. Cada célula hija contiene entonces un centrosoma que dirige la formación de una nueva red de microtúbulos interfásicos.

## *Estabilización de los microtúbulos y polaridad celular*

Debido a su inestabilidad dinámica inherente, en la célula la mayor parte de los microtúbulos están desensamblados. Sin embargo, este comportamiento dinámico puede modificarse por las interacciones de los microtúbulos con otras proteínas. Algunas proteínas celulares intervienen desensamblando los microtúbulos, bien escindiéndolos o bien incrementando la velocidad de despolimerización de la tubulina desde los extremos de los microtúbulos. Otras proteínas (denominadas **proteínas asociadas a microtúbulos** o **MAPs** —*microtubule-associated proteins*—) se fijan a los microtúbulos e incrementan su estabilidad. Dichas interacciones permiten a la célula estabilizar los microtúbulos en localizaciones definidas y son un mecanismo importante para determinar la forma y la polaridad celular.

Se han identificado un gran número de MAPs, y varían en función del tipo de célula. Las mejor caracterizadas son MAP-1, MAP-2 y tau, aisladas a partir de células neuronales y MAP-4, que se encuentra en todos los tipos de células no neuronales de vertebrados. La proteína tau ha sido estudiada extensamente debido a que es el componente principal de las lesiones características encontradas en los cerebros de los pacientes de Alzheimer. La actividad de las MAPs se regula mediante fosforilación, lo que permite a la célula controlar la estabilidad de los microtúbulos.

Un buen ejemplo del papel de los microtúbulos estables en la determinación de la polaridad celular lo constituyen las células nerviosas, que constan de dos tipos diferentes de prolongaciones (axones y dendritas) que se extienden desde el cuerpo celular (Fig. 11.47). Tanto los axones como las dendritas se sujetan mediante microtúbulos estables, además de por los neurofilamentos estudiados en la sección anterior de este Capítulo. Sin embargo, los microtúbulos se organizan de forma diferente en los axones y en las dendritas y están asociados con MAPs distintas. En los axones, todos los microtúbulos se encuentran orientados con sus extremos «más» alejados del cuerpo celular, de manera similar a la orientación general de los microtúbulos en otros tipos celulares. Sin embargo,

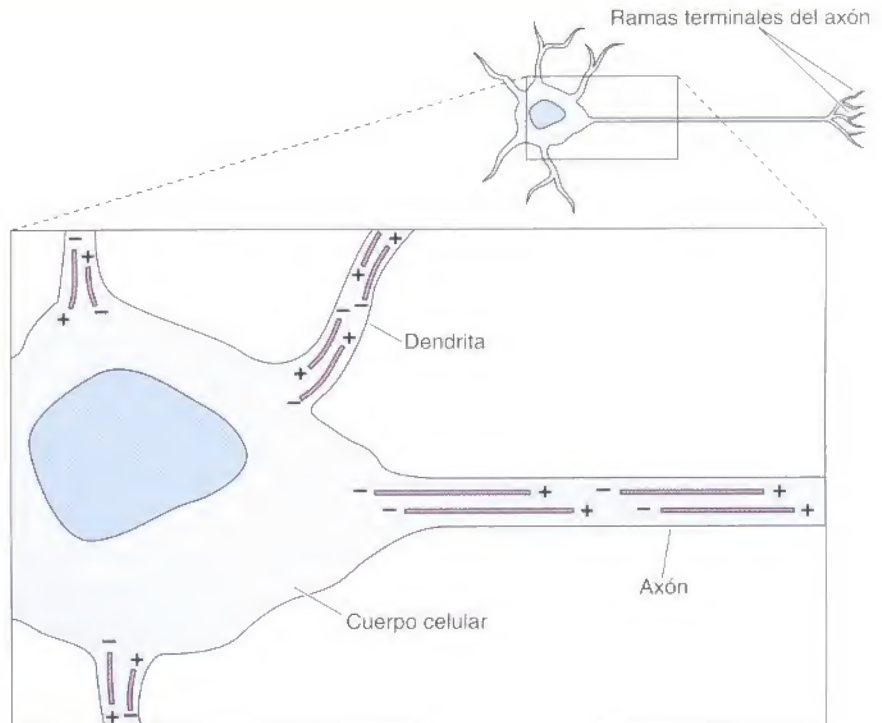



*Figura 11.47*
**Organización de los microtúbulos en las células nerviosas.** Dos tipos distintos de prolongaciones se extienden desde el cuerpo celular de las células nerviosas (neuronas). Las dendritas son prolongaciones cortas que reciben estímulos de otras células nerviosas. El único axón largo transmite impulsos desde el cuerpo celular a otras células, que pueden ser bien otras neuronas o bien células efectoras, tales como el músculo. Los microtúbulos estables tanto en los axones como en las dendritas terminan en el citoplasma en vez de unirse al centrosoma. En las dendritas, los microtúbulos se orientan en ambas direcciones, con sus extremos «más» apuntando tanto hacia el cuerpo celular como hacia el sentido contrario. Por el contrario, todos los microtúbulos de los axones se orientan con sus extremos «más» apuntando hacia el final del axón.

los extremos «menos»de la mayoría de los microtúbulos en los axones no se unen al centrosoma; en su lugar, tanto los extremos «más»como los «menos» de estos microtúbulos terminan en el citoplasma del axón. En las dendritas, los microtúbulos están orientados en ambas direcciones; algunos extremos «más»apuntan hacia el cuerpo celular y otros apuntan hacia la periferia celular. A esta organización diferente de los microtúbulos hay que añadirle las diferencias en las MAPs: los axones contienen proteínas tau, pero no MAP-2, mientras que las dendritas contienen MAP-2, pero no proteínas tau, y parece que estas diferencias en la distribución de MAP-2 y tau son las responsables de la distinta organización de los microtúbulos estables en los axones y las dendritas.

## Motores microtubulares y movimientos

Los microtúbulos son responsables de diversos movimientos celulares, incluyendo el transporte intracelular y el posicionamiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos, la separación de los cromosomas en la mitosis y el batir de los cilios y flagelos. Como se vio anteriormente para los filamentos de actina en este Capítulo, el movimiento a lo largo de los microtúbulos se basa en la acción de proteínas motoras que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP para producir fuerza y movimiento. Los miembros de dos grandes familias de proteínas motoras —las **quinesinas** y las **dineínas**— son los responsables de impulsar los diversos movimientos en los que participan los microtúbulos.

### *Identificación de las proteínas motoras microtubulares*

La quinesina y la dineína, los prototipos de proteínas motoras de los microtúbulos, se mueven a lo largo de los microtúbulos en direcciones opuestas —la quinesina hacia el extremo «más» y la dineína hacia el extremo «menos» (Fig. 11.48). La primera de estas proteínas motoras microtubulares que se identificó fue la dineína, que la aisló Ian Gibbons en 1965. La purificación de esta forma de dineína (denominada **dineína axonémica**) se vio facilitada porque es una proteína muy abundante en los cilios, al igual que la abundancia de miosina facilitó que se aislara a partir de las células musculares. Sin embargo, costó más identificar

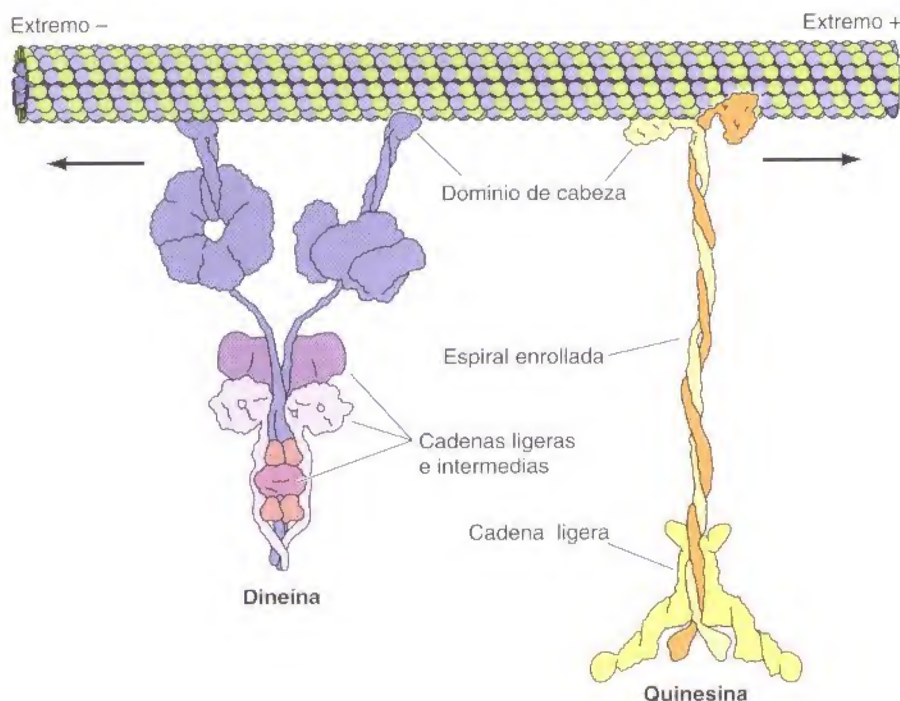
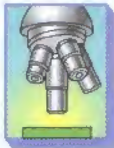



*Figura 11.48*
**Proteínas motoras microtubulares.** La quinesina y la dineína migran en direcciones opuestas a lo largo de los microtúbulos, hacia los extremos «más»y «menos», respectivamente. La quinesina consta de dos cadenas pesadas, enrolladas una sobre la otra en una estructura de hélice enrollada, y de dos cadenas ligeras. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas se fijan a los microtúbulos y son los dominios motores de la molécula. La dineína está constituida por dos o tres cadenas pesadas (aquí se muestran dos) asociadas a varias cadenas ligeras e intermedias. Los dominios de cabeza globular de las cadenas pesadas son los dominios motores. Los modelos mostrados están basados en datos recientes obtenidos por cristalografía de rayos X (R. D. Vale, 2003. *Cell* 112:467).

otros motores microtubulares debido a que las proteínas responsables de procesos como el movimiento de los cromosomas y el transporte de los orgánulos se presentan a concentraciones relativamente bajas en el citoplasma. El aislamiento de estas proteínas dependió del desarrollo de nuevos métodos experimentales para detectar la actividad de los motores moleculares en medios libres de células.

El desarrollo de los ensayos *in vitro* para las proteínas motoras citoplasmáticas se basó en la utilización de la **microscopía vídeo-amplificada**, desarrollada por Robert Allen y Shinya Inoué a principios de los años 80, para estudiar el movimiento de las vesículas de membrana y de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos en los axones de calamar. En este método se utiliza una cámara de vídeo para aumentar el contraste de las imágenes obtenidas con un microscopio óptico, lo que mejora sustancialmente la detección de objetos pequeños y permite que se pueda seguir el movimiento de los orgánulos en las células vivas. Utilizando este abordaje, Allen, Scott Brady y Ray Lasek demostraron que el movimiento de los orgánulos también puede tener lugar en un sistema libre de células en el que se haya retirado la membrana plasmática y se haya extendido un extracto citoplasmático en una platina de cristal. Estas observaciones condujeron al desarrollo de un sistema reconstruido *in vitro*, que proporcionó un método capaz de detectar proteínas celulares responsables del movimiento de los orgánulos. En 1985 Brady, junto con Ronald Vale, Thomas Reese, y Michael Sheetz, se basaron en estas innovaciones para identificar la quinesina (conocida actualmente como quinesina «convencional» o quinesina I) como una nueva proteína motora de los microtúbulos, presente tanto en los axones de sepia como en el cerebro bovino.

Estudios posteriores demostraron que la quinesina I se desplaza a lo largo de los microtúbulos en una única dirección —hacia el extremo «más»—. Debido a que los extremos «más» de los microtúbulos en los axones están todos orientados hacia fuera del cuerpo celular (véase Fig. 11.47), el movimiento de la quinesina en esta dirección transporta las vesículas y orgánulos hacia fuera del cuerpo celular, hacia el final del axón. Sin embargo, en axones intactos también se ha observado que las vesículas y orgánulos migran hacia el interior del cuerpo celular, lo que implica que una proteína motora distinta podría ser la responsable del



## Experimento clave

# *Aislamiento de la quinesina*

**Identificación de una nueva proteína generadora de fuerza, la quinesina, implicada en la movilidad basada en microtúbulos**
Ronald D. Vale, Thomas S. Reese, y Michael P. Sheetz

National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Marine Biological Laboratory, Woods Hold, MA; University of Connecticut Health Center, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA
*Cell, Volume 42, 1985, págs. 39-50*

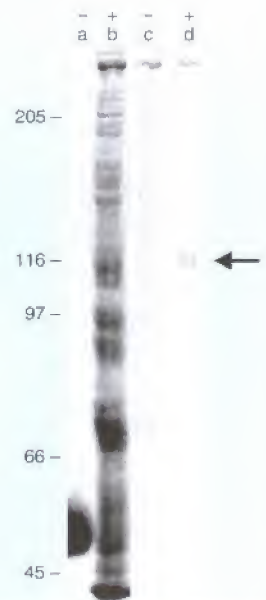
### Contexto

El transporte y posicionamiento de los orgánulos citoplasmáticos es un hecho clave en la organización de las células eucariotas, por lo que comprender los mecanismos responsables del transporte de las vesículas y orgánulos es una cuestión fundamental en biología celular. En 1982, Robert Allen, Scott Brady, Ray Lasek y sus colaboradores emplearon la microscopía amplificada por vídeo para visualizar el movimiento de los orgánulos a lo largo de los filamentos citoplasmáticos en los axones gigantes de calamar, tanto *in vivo* como en un sistema de libre de células. Estos filamentos se identificaron como microtúbulos mediante microscopía electrónica, pero se desconocían las proteínas motoras responsables del movimiento de los orgánulos: el único motor microtubular identificado hasta ese momento era la dineína axonémica, que estaba presente solamente en cilios y flagelos. En 1985, Ronald Vale, Thomas Reese, y Michael Sheetz describieron el aislamiento de una proteína motora nueva, la quinesina, que era responsable del movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos.

Experimentos similares fueron publicados a la vez por Scott Brady (*Nature* 317: 73-75, 1985).

### Experimentos

Dos estrategias experimentales fueron determinantes para el aislamiento de la quinesina. La primera, basada en el trabajo de Allen y sus colaboradores, era el uso de un sistema *in vitro* en el que se podía detectar la actividad de la




Fijación de una proteína motora a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP. Se analizaron muestras de proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida, que se tiñó y fotografió. El peso molecular de las proteínas marcadoras se indica a la izquierda en kilodaltons. La columna a representa microtúbulos purificados, en la que sólo se detecta tubulina (55 kDa). La columna b es un extracto soluble de citoplasma de axón de calamar, conteniendo muchos polipéptidos diferentes. Se incubó este extracto soluble con microtúbulos tanto sin AMP-PNP (columna c) como con él (columna d). Se recuperaron los microtúbulos y se incubaron con ATP para liberar las proteínas fijadas, las cuales fueron sometidas a electroforesis. Nótese que un polipéptido de 110 kDa estaba unido específicamente a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y después se liberó por ATP. También se encontró que las proteínas unidas en presencia de AMP-PNP y liberadas por ATP inducían el movimiento de los microtúbulos (indicado por «+» sobre el gel).

movimiento a lo largo de los microtúbulos en la dirección opuesta —hacia el extremo «menos»—. De acuerdo con esta suposición, estudios posteriores mostraron que una proteína previamente identificada como la proteína asociada a microtúbulos MAP-1C era de hecho una proteína motora que se movía a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «menos». Posteriores análisis demostraron que la MAP-1C está relacionada con la dineína aislada a partir de los cilios (dineína axonémica), por lo que la MAP-1C ahora se denomina **dineína citoplasmática**.

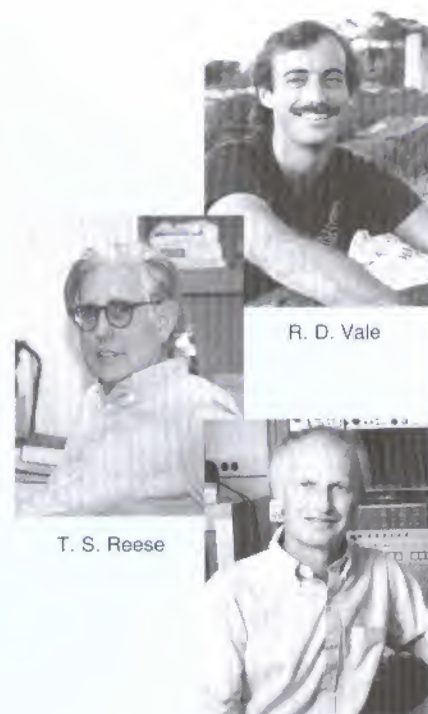
La quinesina I es una molécula de aproximadamente 380 kDa, constituida por dos cadenas pesadas (120 kDa cada una) y dos cadenas ligeras (de 64 kDa cada una) (véase Fig. 11.48). Las cadenas pesadas tienen regiones largas de $\alpha$-hélice que se enrollan una alrededor de la otra en una estructura de hélice enrollada. Los dominios de cabeza globular amino-terminales de las cadenas pesadas son los dominios motores de la molécula: se unen tanto a los microtúbulos como al ATP, cuya hidrólisis proporciona la energía necesaria para el movimiento. Aunque el dominio motor de la quinesina (aproximadamente 340 aminoácidos) es mucho más pequeño que el de la miosina (alrededor de 850

### *Aislamiento de la quinesina* (continuación)

proteína motora. Vale, Reese y Sheetz utilizaron un sistema en el que proteínas del citoplasma de los axones impulsaban el movimiento de los microtúbulos a través de la superficie de una platina de cristal. Estos sistemas libres de células proporcionaron un método sensible y funcional para analizar la actividad de la quinesina como un motor molecular.

La segunda estrategia importante empleada en el aislamiento de la quinesina fue aprovechar su capacidad de unión a los microtúbulos. Lasek y Brady (*Nature* 316: 645-647, 1985) habían observado que los movimientos *in vitro* de los microtúbulos requerían ATP y eran inhibidos por un análogo de ATP (adenilil imidodifosfato, AMP-PNP) que no puede ser hidrolizado y de esta manera no proporciona una fuente de energía útil. En presencia de AMP-PNP los orgánulos permanecían unidos a los microtúbulos, lo que sugería que la proteína motora responsable del movimiento de los orgánulos podría también permanecer unida a los microtúbulos bajo estas condiciones.

A partir de estos descubrimientos, Vale y sus colaboradores incubaron microtúbulos con proteínas citoplasmáticas de axón de calamar en presencia de AMP-PNP. Los microtúbulos se recuperaron e incubaron con ATP para liberar las proteínas que estaban unidas específicamente en presencia del análogo de ATP no hidrolizable. En este experimento se identificó un polipéptido de 110 kDa que se fijaba a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP y que se liberaba tras la incubación con ATP (véase Figura). Además, las proteínas unidas a los microtúbulos y después liberadas por ATP también mantenían el movimiento de los microtúbulos *in vitro*. Por lo tanto, la unión a los microtúbulos en presencia de AMP-PNP proporcionó un abordaje eficaz para aislar la proteína motora, que se mostró por estudios bioquímicos posteriores que contenía el polipéptido de 110 kDa unido a polipéptidos de 60 a 70 kDa. Mediante un abordaje similar, también se purificó una proteína relacionada a partir de cerebro de bovino. Los autores concluyeron que estas proteínas «representan una nueva clase de proteínas motoras que son estructuralmente así como enzimáticamente distintas de la dineína, y proponemos denominar a estos translocadores quinesina (del griego *kinein*, moverse).»


R. D. Vale
T. S. Reese
M. P. Sheetz

#### Impacto

El movimiento de las vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos es fundamental para la organización de las células eucariotas, por lo que las proteínas motoras responsables de estos movimientos desempeñan un papel crítico en la biología celular. Experimentos posteriores empleando modelos *in vitro* similares a los descritos aquí establecieron que la quinesina se desplaza a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», mientras que la dineína citoplasmática es la responsable del transporte de vesículas y orgánulos hacia los extremos «menos» de los microtúbulos. Más aún, desde entonces se ha identificado una gran familia de proteínas relacionadas con la quinesina. Además de su papel en el transporte de las vesículas y orgánulos, los miembros de estas familias de proteínas motoras son responsables de la separación y distribución de los cromosomas durante la mitosis. Por lo tanto, la identificación de la quinesina abrió la puerta para comprender diversos movimientos basados en los microtúbulos que resultan claves para la estructura y función de las células eucariotas.

aminoácidos), la cristalografía de rayos X indica que los dominios motores de la quinesina y la miosina (véase Fig. 11.31) son similares estructuralmente, lo que sugiere que la quinesina y la miosina evolucionaron a partir de un ancestro común. La zona de la cola de la molécula de quinesina está constituida por las cadenas ligeras unidas a los dominios carboxilo-terminales de las cadenas pesadas. Esta región de la quinesina es la responsable de la unión a otros componentes celulares (como vesículas de membrana y orgánulos) que se transportan a lo largo de los microtúbulos por la acción de los motores de quinesina.

La dineína citoplásmica es una molécula extremadamente grande (hasta 2.000 kDa), que está constituida por dos o tres cadenas pesadas (cada una alre-

dedor de 500 kDa) unida con un número variable de polipéptidos ligeros e intermedios, que oscilan entre 14 y 120 kDa (véase Fig. 11.48). Al igual que en la quinesina, las cadenas pesadas forman dominios globulares motores de unión a ATP que son los responsables del movimiento a lo largo de los microtúbulos. La porción basal de la molécula, que incluye las cadenas ligeras e intermedias, se piensa que se une a otras estructuras subcelulares, como orgánulos y vesículas.

Como sucede con las miosinas, tanto la quinesina como la dineína definen familias de proteínas motoras relacionadas. Tras aislarse inicialmente la quinesina en 1985, se han identificado varias proteínas relacionadas con la quinesina. El genoma de *C. elegans* codifica dieciocho quinesinas diferentes, y se piensa que en humanos pueden existir hasta 100 miembros distintos de la familia de la quinesina. Algunos miembros de la familia de la quinesina, como la propia quinesina, se mueven a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo «más» (véase Fig. 11.45). Sin embargo, otros miembros de la familia de la quinesina se mueven en dirección opuesta, hacia el extremo «menos». Los diferentes miembros de la familia de la quinesina varían en la secuencia de sus colas carboxilo-terminales y son los responsables de los movimientos de diferentes tipos de cargamento, incluyendo vesículas, orgánulos y cromosomas, a lo largo de los microtúbulos. También existen varios tipos de dineína axonémica, así como múltiples dineínas citoplasmáticas. Todos los miembros de la familia de la dineína se desplazan hacia el extremo «menos» de los microtúbulos, pero las diferentes dineínas citoplasmáticas pueden transportar cargas diferentes.

### *Transporte de orgánulos y organización intracelular*

Una de las funciones principales de los microtúbulos es transportar vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma de las células eucariotas. Como ya se ha visto, dicho transporte de orgánulos citoplasmáticos resulta evidente en los axones de las células nerviosas, que pueden extenderse más de un metro de longitud. Los ribosomas sólo se localizan en el cuerpo celular y en las dendritas, por lo que las proteínas, las vesículas de membrana, y los orgánulos (p. ej., mitocondrias) han de transportarse desde el cuerpo celular hasta el axón. Mediante la microscopía amplificada por vídeo se puede visualizar el transporte de las vesículas de membrana y de los orgánulos en ambas direcciones a lo largo de los microtúbulos de los axones, donde la quinesina y la dineína llevan sus cargas hasta y desde los extremos de los axones, respectivamente. Por ejemplo, las vesículas secretoras que contienen neurotransmisores se transportan desde el aparato de Golgi hasta las ramas terminales del axón por la quinesina. En la dirección opuesta, la dineína citoplasmática transporta vesículas endocíticas desde el axón hacia el cuerpo celular.

En otros tipos de células los microtúbulos transportan vesículas de membrana y orgánulos de forma similar. Debido a que los microtúbulos están generalmente orientados con sus extremos «menos» unidos al centrosoma y sus extre-

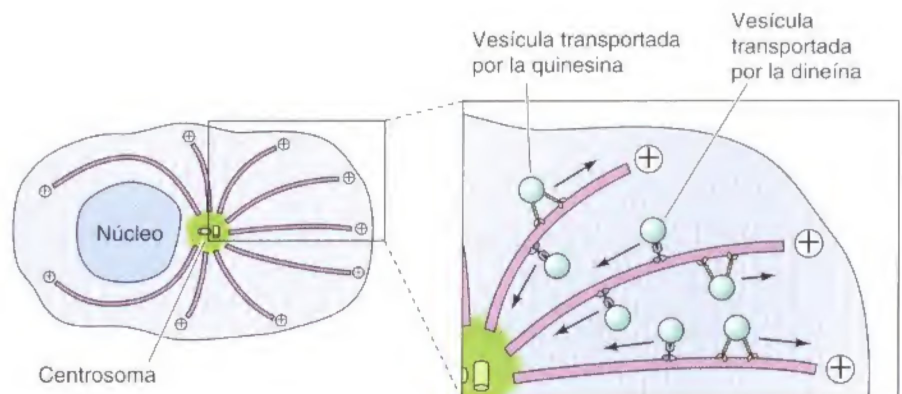



*Figura 11.49*
**Transporte de las vesículas a lo largo de los microtúbulos.** La quinesina y otros miembros de la familia de la quinesina dirigidos hacia el extremo «más», transportan vesículas y orgánulos en dirección a los extremos «más»de los microtúbulos, que se extienden hacia la periferia celular. Por el contrario, la dineína y los miembros de la familia de la quinesina dirigidos al extremo «menos», transportan sus cargas en dirección a los extremos «menos» de los microtúbulos, que se encuentran unidos en el centro de la célula.

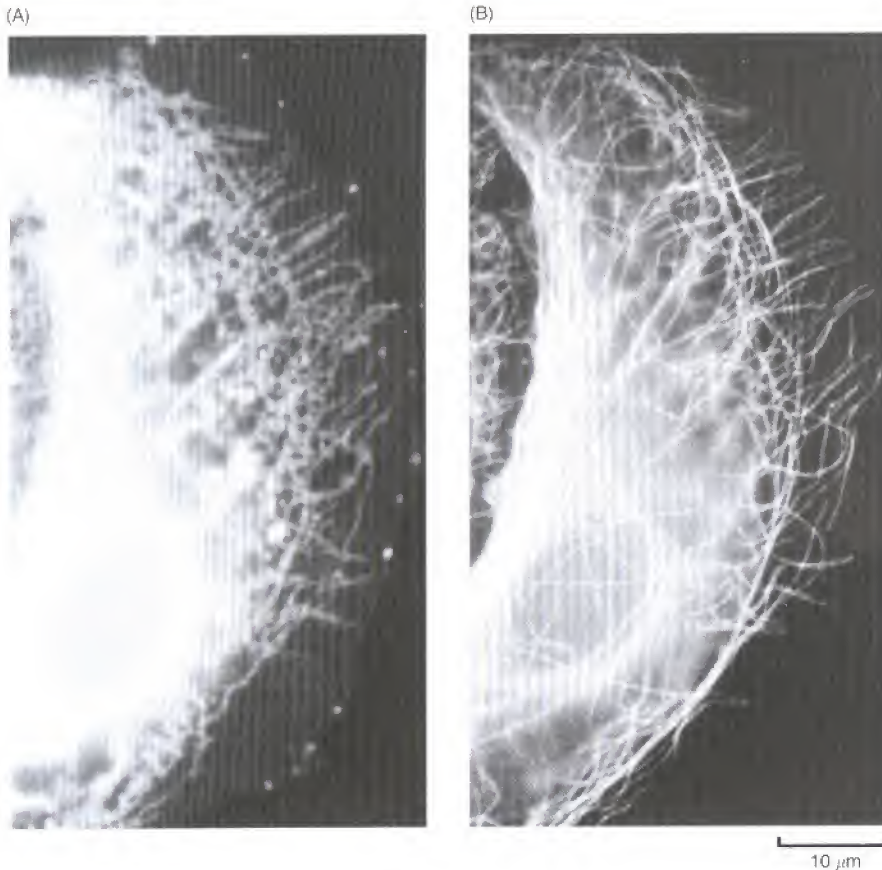



*Figura 11.50*
**Asociación del retículo endoplasmático con los microtúbulos.** Microscopía de fluorescencia del retículo endoplasmático (A) y de microtúbulos (B) en una célula epitelial. El retículo endoplasmático se ha teñido con un tinte fluorescente y los microtúbulos con un anticuerpo contra la tubulina. Nótese la estrecha relación entre el retículo endoplasmático y los microtúbulos en la periferia de la célula. (De M. Terasaki, L. B. Chen y K. Fujiwara, 1986. *J. Cell Biol.* 103: 1557.)

mos «más» extendiéndose hacia la periferia celular, se piensa que los diferentes miembros de las familias de quinesina y dineína transportan las vesículas y los orgánulos en direcciones opuestas a través del citoplasma (Fig. 11.49). La quinesina convencional y otros miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «más», transportan su carga hacia la periferia celular, mientras que las dineínas citoplasmáticas y los miembros de la familia de la quinesina que se dirigen hacia el extremo «menos» transportan los materiales hacia el centro de la célula. Además de transportar vesículas de membrana en las rutas endocítica y secretora, los microtúbulos y las proteínas motoras asociadas colocan los orgánulos con membrana (como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas y mitocondrias) en la célula. Por ejemplo, el retículo endoplasmático se extiende a la periferia celular en asociación con los microtúbulos (Fig. 11.50). Los fármacos que despolimerizan los microtúbulos provocan que el retículo endoplasmático se retraiga hacia el centro de la célula, lo que indica que se requiere la asociación con los microtúbulos para mantener al retículo endoplasmático en su estado extendido. Esta colocación del retículo endoplasmático parece requerir la acción de la quinesina (o posiblemente múltiples miembros de la familia de la quinesina), que tira del retículo endoplasmático a lo largo de los microtúbulos en dirección al extremo «más», hacia la periferia celular. De forma similar, la quinesina parece que desempeña un papel clave en la colocación de los lisosomas alejados del centro de la célula, y en los movimientos de las mitocondrias se han implicado a tres miembros diferentes de la familia de la quinesina.

Por otro lado, se cree que la dineína citoplasmática interviene en la colocación del aparato de Golgi. El aparato de Golgi se localiza en el centro de la célula, cerca del centrosoma. Si los microtúbulos se disgregan, bien por un fármaco o bien cuando la célula entra en mitosis, el Golgi se rompe en pequeñas vesículas que se dispersan por todo el citoplasma. Cuando los microtúbulos se

vuelven a formar, el aparato de Golgi también se reensambla, y parece ser que las vesículas del Golgi son transportadas al centro de la célula (hacia el extremo «menos»de los microtúbulos) por la dineína citoplasmática. Por lo tanto, el movimiento a lo largo de los microtúbulos es responsable no sólo del transporte de vesículas, sino también de estabilizar la posición de los orgánulos con membrana en el citoplasma de las células eucariotas.

### *Separación de los cromosomas mitóticos*

Como se vio anteriormente en este Capítulo, los microtúbulos se reorganizan al comienzo de la mitosis para formar el huso mitótico, que desempeña un papel central en la división celular al distribuir los cromosomas duplicados a los núcleos hijos. Esta distribución crítica del material genético tiene lugar durante la anafase de la mitosis, cuando las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso. El movimiento de los cromosomas se realiza por dos mecanismos distintos, denominados **anafase A** y **anafase B**, en los que intervienen diferentes tipos de microtúbulos del huso y de proteínas motoras asociadas.

La anafase A consiste en el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso a lo largo de los microtúbulos cinetocóricos, que se acortan a medida que se mueven los cromosomas (Fig. 11.51). Este tipo de movimiento cromosómico parece que está dirigido por proteínas motoras asociadas al cinetocoro que trasladan a los cromosomas a lo largo de los microtúbulos del huso en dirección al extremo «menos», hacia los centrosomas. La dineína citoplasmática está asociada a los cinetocoros y puede que intervenga en el movimiento cromosómico hacia los polos, al igual que los miembros de la familia de la quinesina dirigidos al extremo negativo. La acción de estas proteínas motoras cinetocóricas se acopla al desensamblaje y acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos, lo que puede deberse a que algunos miembros de la familia de la quinesina actúen como enzimas desestabilizadoras de microtúbulos.

La anafase B se refiere a la separación de los polos del huso entre sí (Figura 11.52). A la separación de los polos del huso le acompaña un alargamiento de los microtúbulos polares, y es similar a la separación inicial de los centrosomas duplicados para formar los polos del huso al comienzo de la mitosis (véase Fig. 11.46). Durante la anafase B los microtúbulos polares solapados se deslizan unos sobre otros, empujando los polos y separándolos. Se ha encontrado que este tipo de movimiento se debe a la acción de varios miembros de la familia de la quinesina dirigidos hacia el extremo «más», que entrelazan microtúbulos polares y los desplazan hacia el extremo «más» del microtúbulo solapado —alejándolos del polo opuesto del huso. Además, los polos del huso pueden ser separados por los microtúbulos astrales. El mecanismo responsable de este tipo de movimiento no ha sido totalmente establecido, pero podría resultar por la acción de la dineína citoplasmática unida al córtex celular o a otra estructura citoplasmática. El desplazamiento de este motor de dineína a lo largo de los microtúbulos astrales hacia el extremo «menos»podría tener el efecto de separar los polos del huso hacia la periferia de la célula. De manera alternativa, una proteína motora asociada con los polos del huso podría desplazarse por los microtúbulos astrales hacia el extremo «más», lo cual también podría tirar de los polos del huso hacia la periferia celular.

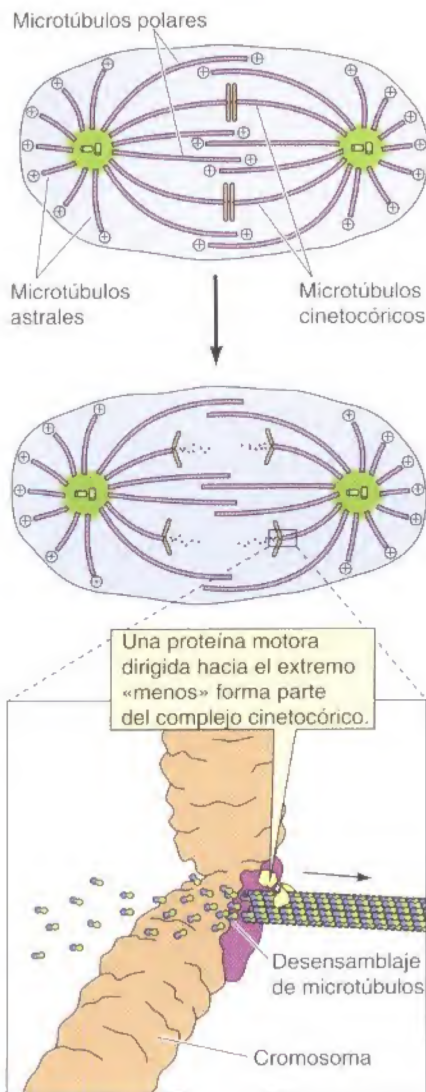



*Figura 11.51*
**Movimiento cromosómico en la anafase A.** Los cromosomas migran hacia los polos del huso a lo largo de los microtúbulos cinetocóricos. Se cree que el movimiento cromosómico está controlado por proteínas motoras dirigidas hacia el extremo «menos» unidas al cinetocoro. La acción de estas proteínas motoras está acoplada al desensamblaje y acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos.

### *Cilios y flagelos*

Los **cilios** y **flagelos** son prolongaciones de la membrana plasmática constituidas por microtúbulos, responsables del movimiento de varios tipos de células eucariotas. Muchas bacterias también poseen flagelos pero estos flagelos procariotas son bastante diferentes de los eucariotas. Los flagelos bacterianos (que no se van a tratar) son filamentos proteicos que se proyectan desde la superficie celular, en vez de prolongaciones de la membrana plasmática sostenidas por microtúbulos.

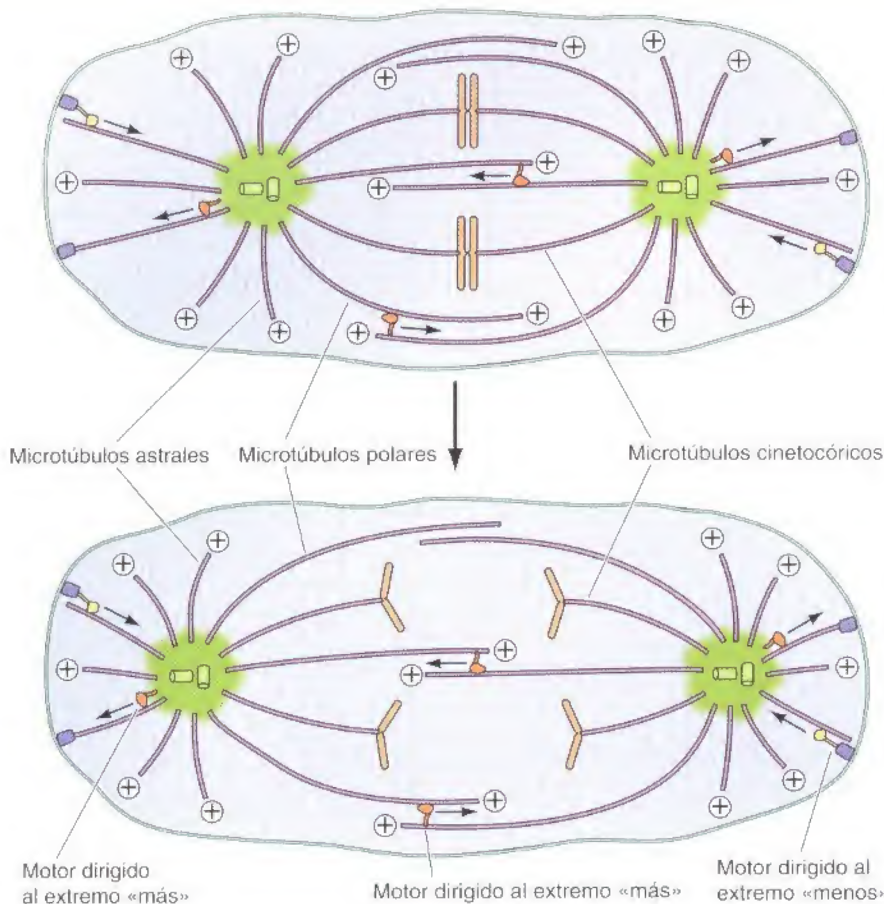
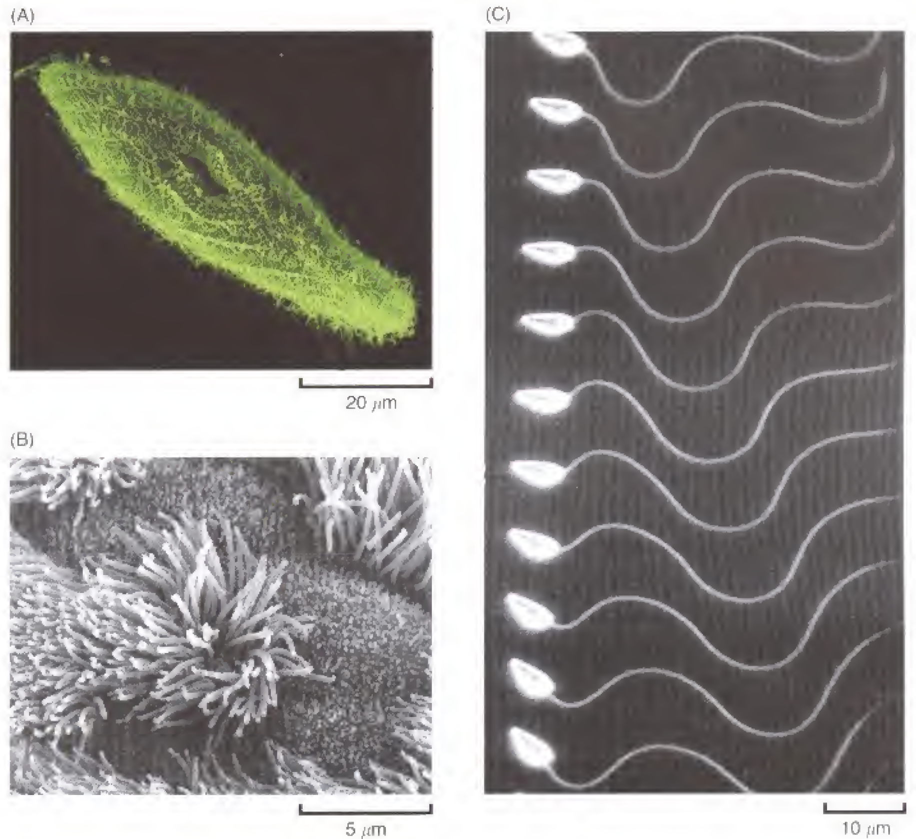


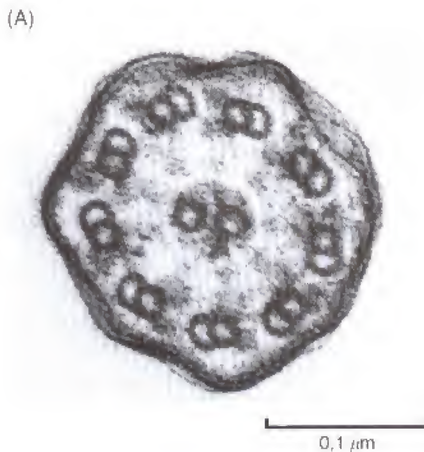

*Figura 11.52*
**Separación de los polos del huso en la anafase B.** La separación de los polos del huso se produce por dos tipos de movimientos. Primero, los microtúbulos polares solapados deslizan unos sobre otros empujando y separando los polos del huso, probablemente como resultado de la acción de proteínas motoras dirigidas hacia el extremo «más». En segundo lugar, los microtúbulos astrales tiran de los polos del huso y los separan. La fuerza conductora podría ser un motor dirigido hacia el extremo «menos», fijado a una estructura citoplasmática, como el córtex celular, o un motor dirigido hacia el extremo «más» y asociado al polo del huso.

Los cilios y los flagelos eucarióticos son estructuras muy similares, cada una con un diámetro de 0,25 $\mu$m, aproximadamente (Fig. 11.53). Muchas células están recubiertas por numerosos cilios, de alrededor de 10 $\mu$m de longitud. Los cilios baten en un movimiento coordinado de atrás hacia adelante, de tal manera que la célula se desplaza a través de un fluido o bien el fluido se desplaza sobre la superficie celular. Por ejemplo, los cilios de algunos protozoos (como el *Paramecium*) son los responsables tanto de la movilidad celular como del barrido de organismos hacia la cavidad oral para su alimentación. Una función importante de los cilios en los animales es el movimiento de los fluidos y del *mucus* sobre la superficie de las capas de células epiteliales. Un buen ejemplo viene dado por las células ciliadas que recubren el tracto respiratorio, que lo limpian de *mucus* y polvo. Los flagelos se diferencian de los cilios en su longitud (pueden llegar a medir 200 $\mu$m) y en su tipo de batido, que es ondulatorio. Las células generalmente tienen solamente uno o dos flagelos, que son los responsables de la locomoción de varios tipos de protozoos y de los espermatozoides.

La estructura fundamental tanto de los cilios como de los flagelos es el **axonema**, que está constituido por microtúbulos y sus proteínas asociadas (Fig. 11.54). Los microtúbulos se disponen en un patrón característico de «9 + 2» en el que

*Figura 11.53*
**Ejemplos de cilios y flagelos.** (A) Micrografía electrónica de barrido mostrando numerosos cilios recubriendo la superficie de *Paramecium*. (B) Micrografía electrónica de barrido de células epiteliales ciliadas recubriendo la superficie de la tráquea. (C) Fotografía de disparo múltiple (500 disparos por minuto) mostrando el movimiento ondulatorio de un flagelo de espermatozoide de erizo de mar. (A, Karl Aufderheide/Visuals Unlimited; B, Fred E. Hossler/Visuals Unlimited; C, C. J. Brokaw, California Institute of Technology.)



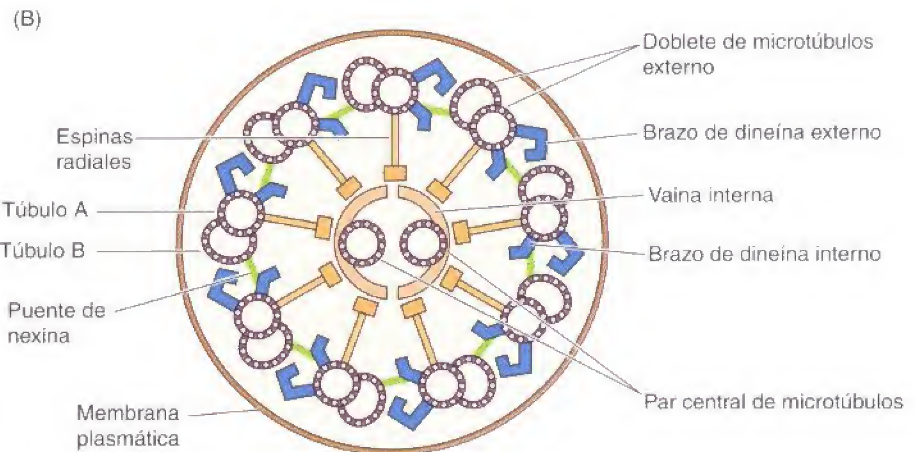




*Figura 11.54*
**Estructura del axonema de cilios y flagelos.** (A) Micrografía electrónica tratada por ordenador de una sección transversal del axonema de un flagelo de espermatozoide de rata. (B) Esquema de una sección transversal de un axonema. Los nueve dobletes externos están constituidos por un microtúbulo completo (A) y uno incompleto (B), constituido solamente por 10 u 11 protofilamentos. Los dobletes externos se unen entre sí por puentes de nexina y al par central de microtúbulos mediante espinas radiales. Cada doblete de microtúbulos externo está unido a brazos de dineína internos y externos. (A, K. G. Murti/Visuals Unlimited.)

un par central de microtúbulos se encuentra rodeado por nueve dobletes de microtúbulos exteriores. Los dos microtúbulos fusionados de cada doblete exterior son distintos: uno (denominado el túbulo A) es un microtúbulo completo constituido por 13 protofilamentos; el otro (el túbulo B) está incompleto, constituido solamente por 10 u 11 protofilamentos unidos al túbulo A. Los dobletes exteriores de microtúbulos se conectan al par central mediante espinas radiales y entre sí mediante puentes formados por una proteína denominada **nexina**. Además, a cada túbulo A están unidos dos brazos de dineína, y es la actividad motora de estas dineínas axonémicas la que dirige el batido de los cilios y flagelos.

Los extremos «menos» de los microtúbulos de los cilios y flagelos están unidos a un **cuerpo basal** que tiene una estructura similar a la del centríolo y que contiene nueve tripletes de microtúbulos (Fig. 11.55). Vimos anteriormente que los centríolos eran componentes del centrosoma, sin que su función estuviera clara. Sin embargo, los cuerpos basales tienen un papel definido en la organización de los microtúbulos del axonema. A saber, cada uno de los dobletes de microtubulos externos del axonema está formado por la extensión de dos de los microtúbulos presentes en los tripletes del cuerpo basal. Por lo tanto, los cuerpos basales sirven para iniciar el crecimiento de los microtúbulos del axonema, así como para anclar los cilios y los flagelos a la superficie de la célula.

Los movimientos de los cilios y flagelos se producen por el deslizamiento de los dobletes externos de microtúbulos uno respecto a otro, impulsados por la actividad motora de la dineína axonémica (Fig. 11.56). La base de la dineína se une a los túbulos A mientras que los grupos de cabeza de la dineína se unen a los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento del grupo de cabeza de la dineína hacia el extremo «menos»provoca que el túbulo A de un doblete se deslice hacia el extremo basal del túbulo B adyacente. Debido a que los dobletes de microtúbulos en un axonema están unidos por puentes de nexina, el deslizamiento de un doblete sobre otro hace que se doblen, lo que constituye la base del movimiento de batido de cilios y flagelos. Sin embargo, está claro que las actividades de las moléculas de dineína en regiones diferentes del axonema se deben regular cuidadosamente para producir el batido coordinado de los cilios y las oscilaciones ondulatorias de los flagelos —un proceso del que todavía se conoce muy poco.

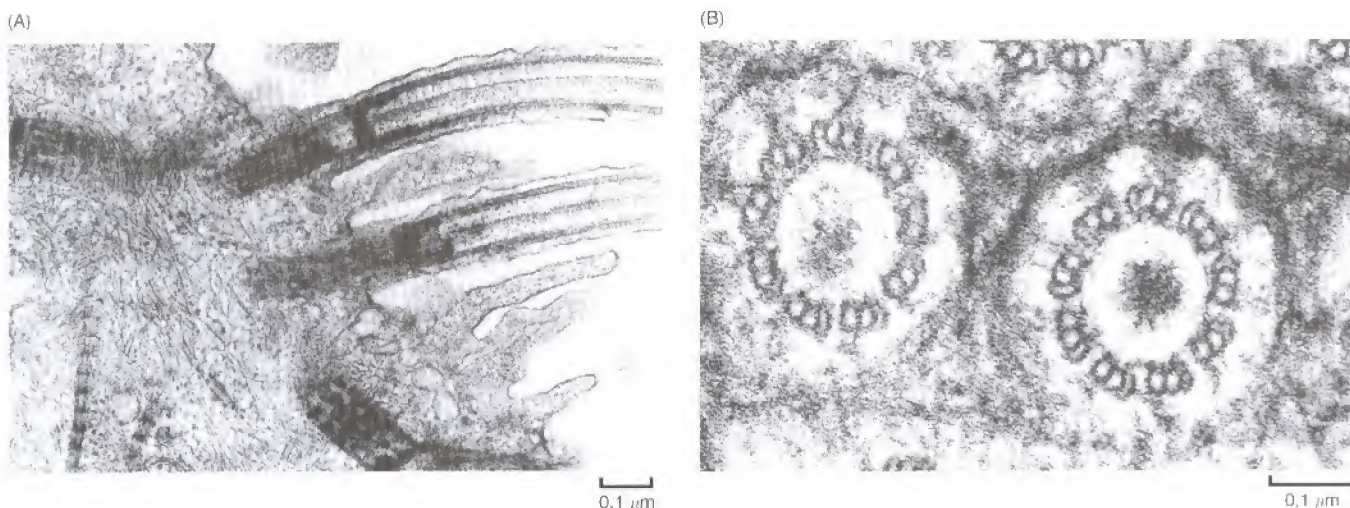



*Figura 11.55*
**Micrografías electrónicas de los cuerpos basales.** (A) Vista longitudinal de cilios anclados en los cuerpos basales. (B) Sección transversal de cuerpos basales. Cada cuerpo basal está constituido por nueve tripletes de microtúbulos. (A, Conly L. Reider/ Biological Photo Service; B, W. L. Dentler, Biological Photo Service.)

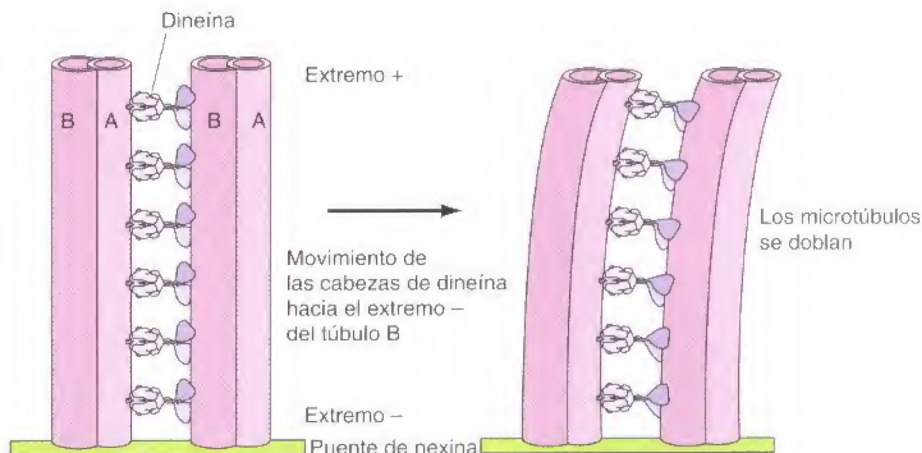



*Figura 11.56*
**Movimiento de los microtúbulos en los cilios y flagelos.** Las bases de los brazos de dineína se unen a los túbulos A, y las cabezas motoras interaccionan con los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento de las cabezas de dineína hacia el extremo «menos» (hacia la base del cilio) provoca entonces que el túbulo A de un doblete se deslice hacia la base del túbulo B adyacente. Debido a que ambos dobletes de microtúbulos están conectados por puentes de nexina, este movimiento de deslizamiento les obliga a doblarse.

## PALABRAS CLAVE

**actina, microfilamento, actina globular (G), actina filamentosa (F), intercambio rotatorio, citocalasina, faloidina, proteína de unión a la actina, complejo Arp2/3, ADF/cofilina, profilina**

**haz de actina, red de actina, proteína formadora de haces de actina, fimbrina, haz contráctil, $\alpha$-actinina, filamina**

**córtex celular, espectrina, anquirina, fodrina, proteínas ERM, distrofina, integrina, adhesión focal, fibra de estrés, talina, vinculina, unión adherente, cinturón de adhesión, cadherina, cateninas**

**microvellosidad, borde en cepillo, estereocilio, villina, pseudópodo, lamelipodio, microespina, filopodio**

**miosina, motor molecular, fibra muscular, miofibrilla, sarcómero, titina, nebulina, modelo de deslizamiento de los filamentos, miosina II, retículo sarcoplásmico, tropomiosina, troponina**

## RESUMEN

### ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA

***Ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina:*** Los filamentos de actina se forman por la polimerización cabeza-cola de los monómeros de actina, dando lugar a una hélice. Varias proteínas de unión a la actina regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos dentro de la célula.

***Organización de los filamentos de actina:*** Los filamentos de actina están unidos transversalmente por proteínas de unión a la actina para formar haces o redes tridimensionales.

***Asociación de los filamentos de actina con la membrana plasmática:*** Una red de filamentos de actina y de otras proteínas citoesqueléticas subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular. Los haces de actina también se unen a la membrana plasmática y fijan a la célula en regiones de contacto célula-célula y célula-sustrato.

***Protuberancias de la superficie celular:*** Los filamentos de actina sostienen protuberancias permanentes de la superficie celular, como las microvellosidades, así como extensiones transitorias responsables de la fagocitosis y de la locomoción celular.

### ACTINA, MIOSINA Y MOVIMIENTO CELULAR

***Contracción muscular:*** Los estudios en el músculo establecieron el papel de la miosina como una proteína motora que utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para generar fuerza y movimiento. La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos de actina y miosina entre sí. La hidrólisis de ATP dirige ciclos repetidos de interacciones entre la miosina y la actina, durante los cuales, los cambios conformacionales provocan el movimiento de las cabezas de miosina a lo largo de los filamentos de actina.

***Asociaciones contráctiles de actina y miosina en células no musculares:*** Asociaciones de actina y miosina II son las responsables de diversos movimientos en las células no musculares, incluyendo la citocinesis.

citocinesis, anillo contráctil, quinasa de la cadena ligera de miosina, calmodulina

***Miosinas no convencionales:*** Otros tipos de miosina que no actúan en la contracción sirven para el transporte de vesículas de membrana y orgánulos a lo largo de los filamentos de actina.

miosina I

***Migración y arrastre celular:*** El arrastre celular es un proceso complejo en el que se forman extensiones de la membrana plasmática por la polimerización de los filamentos de actina en el borde anterior de la célula. Estas extensiones entonces se unen al sustrato, y el borde posterior se retrae al interior del cuerpo celular.

## FILAMENTOS INTERMEDIOS

***Proteínas de filamentos intermedios:*** Los filamentos intermedios son polímeros de más de 50 proteínas diferentes que se expresan en varios tipos de células. No están implicados en el movimiento celular pero proporcionan apoyo mecánico a las células y tejidos.

filamento intermedio, queratina, queratina dura, queratina blanda, vimentina, desmina, proteína de neurofilamentos (NF)

***Ensamblaje de filamentos intermedios:*** Los filamentos intermedios se forman a partir de dímeros de dos cadenas polipeptídicas enrolladas una sobre otra en una estructura de hélice enrollada. Estos dímeros se asocian para formar tetrámeros, que se ensamblan en protofilamentos. Los filamentos intermedios están constituidos por protofilamentos enrollados uno sobre otro en una estructura a modo de cuerda.

***Organización intracelular de los filamentos intermedios:*** Los filamentos intermedios forman una red que se extiende desde un anillo que rodea al núcleo hasta la membrana plasmática de la mayoría de las células. En las células epiteliales los filamentos intermedios se unen a la membrana plasmática en regiones de contactos celulares especializados (desmosomas y hemidesmosomas). Los filamentos intermedios también tienen una función especializada en el músculo y en las células nerviosas.

desmosomas, hemidesmosomas, plaquina

***Funciones de las queratinas y de los neurofilamentos: enfermedades de la piel y del sistema nervioso:*** La importancia de los filamentos intermedios como estructuras que proporcionan fuerza mecánica a las células en los tejidos ha sido demostrada mediante experimentos de introducción de genes de queratina mutados en ratones transgénicos. Mutaciones similares en los genes de la queratina son responsables de algunas enfermedades humanas de la piel, y las alteraciones de los neurofilamentos han sido implicadas en el desarrollo de enfermedades en las motoneuronas.

## MICROTÚBULOS

***Estructura, ensamblaje e inestabilidad dinámica de los microtúbulos:*** Los microtúbulos se forman por la polimerización reversible de la tubulina. Muestran inestabilidad dinámica y sufren ciclos continuos de ensamblaje y desensamblaje como resultado de la hidrólisis de GTP tras la polimerización de la tubulina.

microtúbulo, tubulina, inestabilidad dinámica, colchicina, colcemida, vincristina, vimblastina, taxol

***Centrosoma, centríolos y organización de los microtúbulos:*** En la mayoría de las células los microtúbulos se extienden desde un centro organizador de microtúbulos, o centrosoma, localizado cerca del centro de la célula. En las células animales el centrosoma generalmente está constituido por un par de centríolos rodeados por el material pericentriolar. El crecimiento de los microtúbulos se inicia en el material pericentriolar, que así sirve para anclar sus extremos «menos».

centro organizador de microtúbulos, centrosoma, centríolo, material pericentriolar

huso mitótico, microtúbulos cinetocóricos, microtúbulos polares, microtúbulos astrales

***Reorganización de los microtúbulos durante la mitosis:*** Los microtúbulos se reorganizan al comienzo de la mitosis para formar el huso mitótico, que es responsable de la segregación de los cromosomas.

proteína asociada a microtúbulos (MAP)

***Estabilización de los microtúbulos y polaridad celular:*** La estabilización selectiva de los microtúbulos por proteínas asociadas a microtúbulos puede determinar la forma y la polaridad celular, así como la extensión de axones y dendritas de las células nerviosas.

## MOTORES MICROTUBULARES Y MOVIMIENTOS

quinesina, dineína, dineína axonémica, microscopía vídeo amplificada, dineína citoplasmática

***Identificación de proteínas motoras microtubulares:*** Dos familias de proteínas motoras, las quinesinas y las dineínas, son las responsables del movimiento a lo largo de los microtúbulos. La quinesina y la mayoría de las proteínas relacionadas con la quinesina se desplazan en dirección al extremo «más», mientras que las dineínas y algunos miembros de la familia de la quinesina se mueven hacia los extremos «menos» de los microtúbulos.

***Transporte de orgánulos y organización intracelular:*** El movimiento a lo largo de los microtúbulos transporta vesículas de membrana y orgánulos a través del citoplasma, al igual que coloca los orgánulos citoplasmáticos en la célula.

anafase A, anafase B

***Separación de los cromosomas mitóticos:*** Durante la anafase de la mitosis, los cromosomas hijos se separan y migran a polos opuestos del huso mitótico. La separación cromosómica se produce por varios tipos de movimientos en los que participan distintas clases de microtúbulos del huso y proteínas motoras.

cilio, flagelo, axonema, nexina, cuerpo basal

***Cilios y flagelos:*** Los cilios y flagelos son extensiones de la membrana plasmática mantenidas por microtúbulos. Sus movimientos se producen por el deslizamiento de los microtúbulos, dirigido por la acción de motores de dineína.

## Preguntas

1. ¿Qué le da a un filamento de actina una clara polaridad con un extremo positivo y uno negativo?
2. ¿Qué es el intercambio rotatorio (*treadmilling*) y a qué concentración de monómeros se produce?
3. Compara la acción de la citocalasina y la faloidina sobre los filamentos de actina que llevan a cabo intercambio rotatorio.
4. ¿Cómo regulan las proteínas de unión a la actina cofilina, profilina y Arp2/3 el ensamblaje y renovación de filamentos de actina?
5. Un niño de 5 años llega a su clínica con una debilidad muscular de comienzo reciente, y descubres un patrón hereditario de esta enfermedad en la familia de la madre. ¿Cuáles son el diagnóstico y la causa más probable de su enfermedad?
6. ¿Qué bandas o zonas de un sarcómero muscular cambian de longitud durante la contracción? ¿Por qué no modifica su longitud la banda A?
7. ¿Por qué es importante la polaridad de los filamentos de actina en la contracción muscular?
8. ¿Cómo permite la liberación de $Ca^{2+}$ del retículo sarcoplásmico que se contraiga un músculo estriado?
9. ¿Esperarías que las mutaciones en los genes de queratina afectaran a los fibroblastos?
10. ¿En qué se parecen y en qué se diferencia la quinesina y la miosina II?
11. ¿Cómo afectaría al movimiento de los cilios la eliminación de la nexina?

## Bibliografía

### Referencias generales


Bray, D. 2001. *Cell Movements*, 2nd ed., New York: Garland Publishing.


### Estructura y organización de los filamentos de actina


Bamburg, J. R. and O. P. Wiggan. 2002. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12: 598-605. [R]

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 27-66. [R]

Campbell, K. P. 1995. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679. [R]

Chen, L. F., H. Winkler, M. K. Reedy, M. C. Reedy and K. A. Taylor. 2002. Molecular modeling of averaged rigor crossbridges from tomograms of insect flight muscle. *J. Struct. Biol.* 138(1-2): 92-104.

Cooper, J. A., M. A. Wear and A. M. Weaver. 2001. Arp2/3 complex: advances on the inner workings of a molecular machine. *Cell* 107: 703-705. [R]

Dawe, H. R., L. S. Minamide, J. R. Bamburg and L. P. Cramer. 2003. ADF/Cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol.* 13: 252-257. [P]

Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44-49. [P]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37-44. [P]

Luna, E. J. and A. L. Hitt. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258: 955-964. [R]

Machesky L. M., S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove and T. D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127: 107-115. [P]

Pollard, T. D., S. Almo, S. Quirk, V. Vinson and E. E. Lattman. 1994. Structure of actin binding proteins: Insights about function at atomic resolution. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 207-249. [R]

Schmidt, A. and M. N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 305-338. [R]

Winder, S. J. 2003. Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 14-22. [R]

Yap, A. S., W. M. Brieher and B. M. Gumbiner. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 119-146. [R]


### Actina, miosina y movimiento celular


Chou, Y. H., B. T. Helfand and R. D. Goldman. 2001. New horizons in cytoskeletal dynamics: Transport of intermediate filaments along microtubule tracks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 106-109. [R]

Erickson, H. P. 1997. Stretching single protein molecules: Titin is a weird spring. *Science* 276: 1090-1092. [R]

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368: 113-119. [P]

Geeves, M. A. and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 687-728. [R]

Goldman, Y. E. 1998. Wag the tail: Structural dynamics of actomyosin. *Cell* 93: 1-4. [R]

Higuchi, H. and S. A. Endow. 2002. Directionality and processivity of molecular motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 50-57. [R]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164: 1356-1366. [R]

Huxley, H. E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973-976. [P]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971-973. [P]

Pantaloni, D., C. Le Clainche and M. F. Carlier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science* 292: 1502-1506. [R]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50-58. [P]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65. [P]

Ruppel, K. M. and J. A. Spudich. 1996. Structure-function analysis of the motor domain of myosin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 543-573. [R]

Small, J. V., T. Stradal, E. Vignal and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: Where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12: 112-120. [R]

Tan, J. L., S. Ravid and J. A. Spudich. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 721- 759. [R]

Trinick, J. and L. Tskhovrebova. 1997. Titin: A molecular control freak. *Trends Cell Biol.* 9: 377-380. [R]

Turner, C. E. and M. C. Brown. 2001. Cell motility: ARNO and ARF6 at the cutting edge. *Curr. Biol.* 11: R875-R877. [R]

Zot, A. S. and J. D. Potter. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. Ann. Rev. *Biophys. Biophys. Chem.* 16: 535-559. [R]


### Filamentos intemedios


Bonifas, J. M., A. L. Rothman and E. H. Epstein, Jr. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254: 1202-1205. [P]

Brown, R. H., Jr. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis: Recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 80: 687-692. [R]

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301-1311. [P]

Coulombe, P. A. and M. B. Omary. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 110-122. [R]

Fuchs, E. and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279: 514-519. [R]

Fuchs, E. and Y. Yang. 1999. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 98: 547-550. [R]

Fuchs, E. and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3: 199-209. [R]

Schwarz, M. A., K. Owaribe, J. Kartenbeck and W. W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 461-491. [R]

Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365-380. [P]


### Microtúbulos


Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 25-34. [R]

Cassimeris, L. 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 18-24. [R]

Desai, A. and T. J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 83-117. [R]

Drewes, G., A. Ebneth and E.-M. Mandelkow. 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* 23: 307-311. [R]

Hays, T. and M. Li. 2001. Kinesin transport: driving kinesin in the neuron. *Curr. Biol.* *11*: R136-R139. [R]

Job, D., O. Valiron and B. Oakley. 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 111-117. [R]

Karsenti, E. and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* 294: 543-547. [R]

Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow. 2002. Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 12: 585-591. [R]

Marshall, W. F. 2001. Centrioles take center stage. *Curr. Biol.* 11: R487-R496. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242. [P]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312: 232-237. [P]

Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan and K. H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79-88. [P]

Oakley, B. R., C. E. Oakley, Y. Yoon and M. K. Jung. 1990. γ-Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289-1301. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867-871. [P]

Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a g-tubulin-containing ring complex. Nature 378: 578-583. [P]

### *Motores microtubulares y movimientos*

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73-75. [P]

Brady, S. T., R. J. Lasek and R. D. Allen. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129-1131. [P]

Desai, A., S. Verma, T. J. Mitchison and C. E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96: 69-78. [P]

Gibbons, I. R. 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91: 107s-124s. [R]

Gibbons, I. R., and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149: 424-426. [P]

Lasek, R. J. and S. T. Brady. 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316: 645-647. [P]

Rieder, C. L. and E. D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8: 310-318. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154-157. [R]

Saunders, W. S. 1993. Mitotic spindle pole separation. *Trends Cell Biol.* 3: 432-437. [R]

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50. [P]

Vallee, R. B. and M. P. Sheetz. 1996. Targeting of motor proteins. *Science* 271: 1539-1544. [R]

# 12 Superficie celular



TODAS LAS CÉLULAS —TANTO PROCARIOTAS COMO EUCARIOTAS— están rodeadas por la membrana plasmática, que define el límite de la célula y separa su contenido interno del medio externo. Debido a que actúa como una barrera selectiva al paso de las moléculas, la membrana plasmática determina la composición del citoplasma. En último término esto define la identidad de la célula, por lo que la membrana plasmática es una de las estructuras más importantes de la evolución celular. De hecho, como se estudió en el Capítulo 1, se cree que la primera célula surgió al quedar rodeado un ARN autorreplicante por una membrana de fosfolípidos.

La membrana plasmática de las células actuales se compone tanto de lípidos como de proteínas. La estructura básica de la membrana plasmática es la bicapa lipídica, que es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Por lo tanto, el paso de iones y de la mayor parte de las moléculas biológicas a través de la membrana plasmática es mediado por proteínas, que son las responsables del tráfico selectivo de las moléculas tanto al interior como al exterior celular. Otras proteínas de la membrana plasmática controlan las interacciones entre las células de los organismos multicelulares y actúan como sensores a través de los cuales la célula recibe señales del medio. Por lo tanto, la membrana plasmática desempeña un papel doble: aísla al citoplasma e igualmente media las interacciones entre la célula y su medio.

## Estructura de la membrana plasmática

Como todas las demás membranas celulares, la membrana plasmática está constituida por lípidos y proteínas. La estructura fundamental de la membrana es la bicapa lipídica, que forma una barrera estable entre dos compartimentos acuosos. En el caso de la membrana plasmática estos compartimentos son el interior y el exterior celular. Las proteínas embebidas dentro de la bicapa lipídica llevan a cabo las funciones específicas de la membrana plasmática, incluyendo el transporte selectivo de moléculas y el reconocimiento intercelular.

### *Bicapa lipídica*

La membrana plasmática es la membrana que se ha estudiado más a fondo de todas las membranas celulares, y la concepción actual que tenemos de la estructura de las membranas se debe, en gran medida, a las investigaciones sobre la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de los glóbulos rojos sanguíneos de los mamíferos (eritrocitos) han sido particularmente útiles como modelo para el estudio de la estructura de las membranas. Los glóbulos rojos

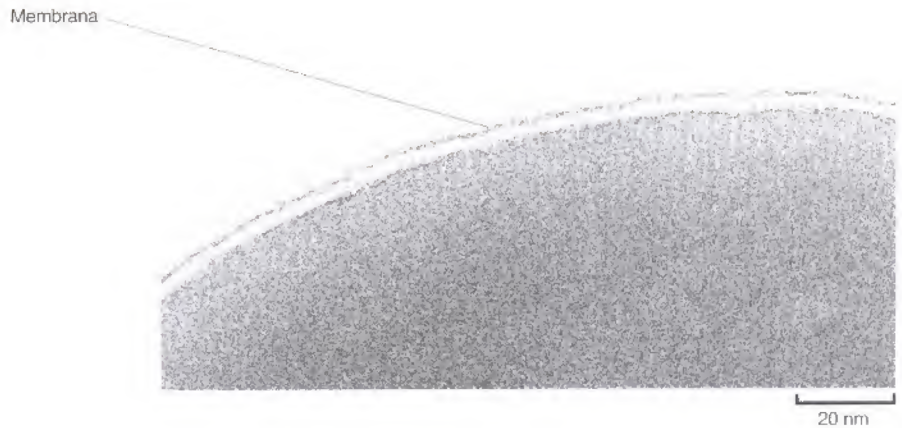



*Figura 12.1*
**Estructura en bicapa de la membrana plasmática.** Micrografía electrónica de un glóbulo rojo humano. Nótese la apariencia de «vía de tren» de la membrana plasmática. (Cortesía de J. David Robertson, Duke University Medical Center.)

de los mamíferos no contienen núcleo ni membranas internas, por lo que representan una fuente a partir de la cual aislar fácilmente las membranas plasmáticas puras para su análisis bioquímico. De hecho, los estudios sobre la membrana plasmática de los glóbulos rojos proporcionaron la primera evidencia de que las membranas biológicas estaban constituidas por una bicapa lipídica. En 1925, dos científicos holandeses (E. Gorter y R. Grendel) extrajeron los lípidos de membrana de un número conocido de glóbulos rojos, que se correspondían a una superficie conocida de membrana plasmática. Entonces determinaron la superficie ocupada por una única capa de los lípidos extraídos, al extenderlos sobre una interfase aire-agua. La superficie ocupada por la monocapa lipídica resultó ser el doble de la ocupada por las membranas plasmáticas eritrocíticas, lo que llevó a la conclusión de que las membranas estaban constituidas por bicapas lipídicas en lugar de por monocapas.

La estructura en bicapa de la membrana plasmática de los eritrocitos se pone de manifiesto claramente mediante micrografías electrónicas de elevado aumento (Fig. 12.1). La membrana plasmática aparece como dos líneas densas separadas por un espacio intermedio —una morfología referida frecuentemente como apariencia de «vía de ferrocarril». Esta imagen se obtiene debido a la unión de los metales pesados electrodensos, empleados como tinción en la microscopía electrónica de transmisión (véase Cap. 1), sobre las cabezas polares de los fosfolípidos que de esta manera aparecen como líneas oscuras. Estas líneas densas están separadas por la porción interna de la membrana, teñida muy ligeramente, que contiene las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas.

Como se describió en el Capítulo 2, las membranas plasmáticas de las células animales contienen cuatro fosfolípidos principales (**fosfatidilcolina**, **fosfatidiletanolamina**, **fosfatidilserina**, y **esfingomielina**), que juntos constituyen más de la mitad de los lípidos en la mayoría de las membranas. Estos fosfolípidos se distribuyen de manera asimétrica entre las dos mitades de la bicapa de la membrana (Fig. 12.2). La capa externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina son los fosfolípidos predominantes de la capa interna. Un quinto fosfolípido, el **fosfatidilinositol**, se encuentra también localizado en la capa interna de la membrana plasmática. Aunque el fosfatidilinositol es un componente cuantitativamente minoritario, desempeña un papel importante en la señalización celular, tal y como se tratará en el siguiente capítulo. Los grupos de la cabeza tanto de la fosfatidilserina como del fosfatidilinositol están cargados negativamente, por lo que su presencia predominante en la capa interna da lugar a una carga neta negativa en la cara citosólica de la membrana plasmática.

Además de los fosfolípidos, las membranas plasmáticas de las células animales contienen **glicolípidos** y **colesterol**. Los glicolípidos se encuentran exclusivamente en la capa externa de la membrana plasmática, con sus residuos

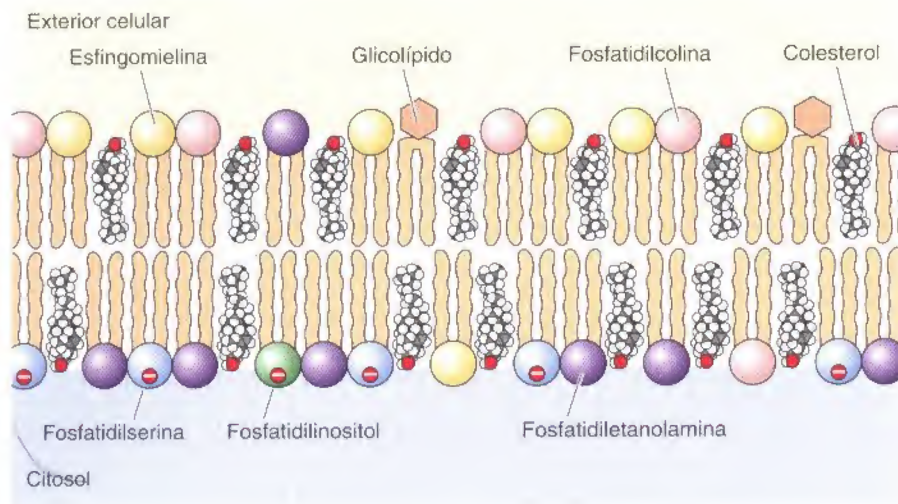



*Figura 12.2*
**Componentes lipídicos de la membrana plasmática.** La capa externa está constituida predominantemente por fosfatidilcolina, esfingomielina y glicolípidos, mientras que la capa interna contiene fosfatidil etanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. El colesterol se distribuye en ambas capas. Se indica la carga neta negativa de las cabezas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Las estructuras de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol se muestran en las Figuras 2.7, 2.8 y 2.9, respectivamente.

hidrocarbonados expuestos a la superficie celular. Son componentes relativamente minoritarios, constituyendo sólo cerca del 2 % de los lípidos de la mayoría de las membranas plasmáticas. El colesterol, por el contrario, es un componente mayoritario de las membranas de las células animales, estando presente en casi las mismas cantidades molares que los fosfolípidos.

Dos características generales de las bicapas fosfolipídicas resultan críticas para la función de la membrana. Primero, la estructura de los fosfolípidos es la responsable de la actuación de las membranas como barreras entre dos compartimentos acuosos. Debido a que el interior de la bicapa fosfolipídica está ocupado por cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas, la membrana es impermeable a moléculas hidrosolubles, incluyendo iones y la mayoría de las moléculas biológicas. Segundo, las bicapas de los fosfolípidos que se encuentran en la naturaleza son fluidos viscosos, no sólidos. Los ácidos grasos de la mayor parte de los fosfolípidos naturales tienen uno o más enlaces dobles, que introducen codos en las cadenas hidrocarbonadas y dificultan su empaquetamiento. Por lo tanto, las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos se mueven libremente en el interior de la membrana, por lo que la membrana es ligera y flexible. Además, tanto los fosfolípidos como las proteínas son libres de difundir lateralmente dentro de la membrana —una propiedad fundamental para muchas de las funciones de la membrana—.

Debido a su estructura en anillo rígido, el colesterol desempeña un papel característico en la estructura de la membrana. El colesterol no formará una membrana por sí mismo, pero se inserta dentro de la bicapa de fosfolípidos con sus grupos polares hidróxilo próximos a las cabezas de los fosfolípidos (véase Fig. 12.2). Dependiendo de la temperatura, el colesterol tiene efectos diferentes sobre la fluidez de la membrana. A temperaturas altas el colesterol interfiere con el movimiento de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que disminuye la fluidez de la parte externa de la membrana y reduce su permeabilidad a las moléculas pequeñas. A bajas temperaturas, sin embargo, el colesterol tiene el efecto opuesto: al interferir con las interacciones entre las cadenas de los ácidos grasos el colesterol protege a las membranas de congelarse y mantiene la fluidez de la membrana. Aunque el colesterol no está presente en bacterias, es un componente esencial de las membranas plasmáticas de las células animales. Las células vegetales también carecen de colesterol, pero contienen unos compuestos relacionados (esteroles) que llevan a cabo una función similar.

Estudios recientes sugieren que no todos los lípidos difunden libremente por la membrana plasmática. Parece que determinados dominios de membrana es-

tán enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (esfingomielina y glicolípidos). Estos grupos de esfingolípidos y colesterol se cree que forman «balsas» que se mueven lateralmente dentro de la membrana plasmática y que pueden asociarse con proteínas de membrana específicas. Aunque todavía no se comprende la función de las balsas lipídicas, puede que desempeñen un papel importante en procesos como la señalización celular y la toma de moléculas extracelulares por endocitosis.

### *Proteínas de membrana*

Mientras los lípidos son los elementos estructurales fundamentales de las membranas, las proteínas son las responsables de realizar las funciones específicas de la misma. La mayor parte de las membranas plasmáticas están compuestas por, aproximadamente, un 50 % de lípidos y un 50 % de proteínas en peso, constituyendo las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos y glicoproteínas de un 5 % a un 10 % de la masa de la membrana. Como las proteínas son mucho más grandes que los lípidos, este porcentaje corresponde a casi una molécula de proteína por cada 50 ó 100 moléculas de lípidos. En 1972, Jonathan Singer y Garth Nicolson propusieron el **modelo de mosaico fluido** de la estructura de la membrana, que actualmente está aceptado como el paradigma fundamental de la organización de todas las membranas biológicas. En este modelo, las membranas se consideran fluidos bidimensionales en los que las proteínas se insertan dentro de bicapas lipídicas (Fig. 12.3).

Singer y Nicolson distinguieron dos clases de proteínas asociadas a la membrana, a las que denominaron **proteínas periféricas** e **integrales de membrana**. Las proteínas periféricas de membrana se definieron operativamente como proteínas que se disociaban de la membrana tras el tratamiento con agentes polares, como soluciones de pH extremo o de alta concentración salina, que no rompen la bicapa fosfolipídica. Una vez disociadas de la membrana, las proteínas periféricas de membrana son solubles en tampones acuosos. Estas proteínas no se insertan en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. En vez de esto, se asocian indirectamente con las membranas a través de interacciones proteína-proteína. Estas interacciones frecuentemente implican enlaces iónicos, que se ven afectados por el pH extremo o la alta salinidad.

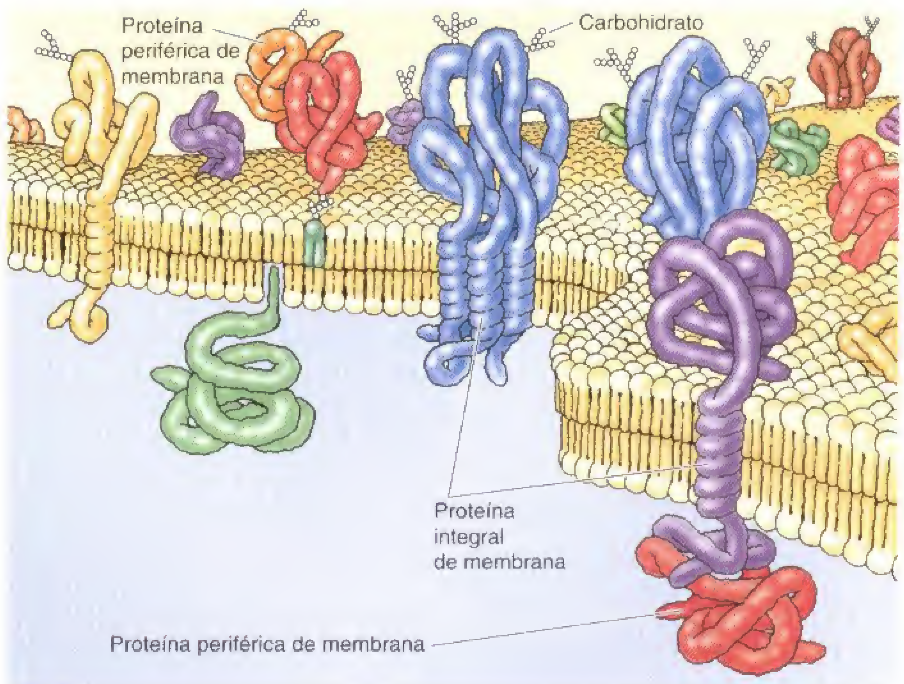
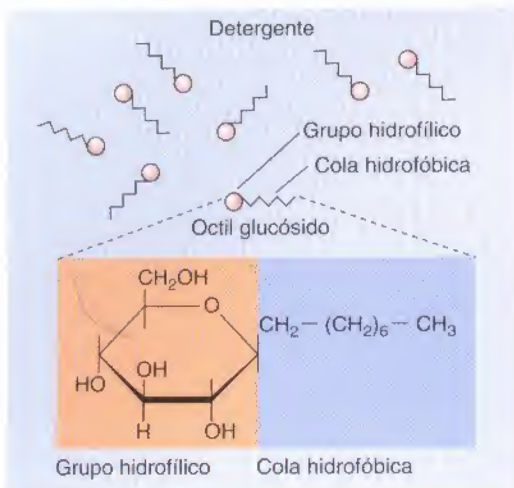



*Figura 12.3*
**Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática.** Las proteínas integrales de membrana se insertan dentro de la bicapa lipídica, mientras que las proteínas periféricas se fijan a la membrana indirectamente mediante interacciones proteína-proteína. La mayoría de las proteínas integrales de membrana es proteína transmembrana, con porciones expuestas a ambos lados de la bicapa lipídica. La parte extracelular de estas proteínas aparece generalmente glicosilada, al igual que las proteínas periféricas de membrana unidas a la cara externa de la misma.



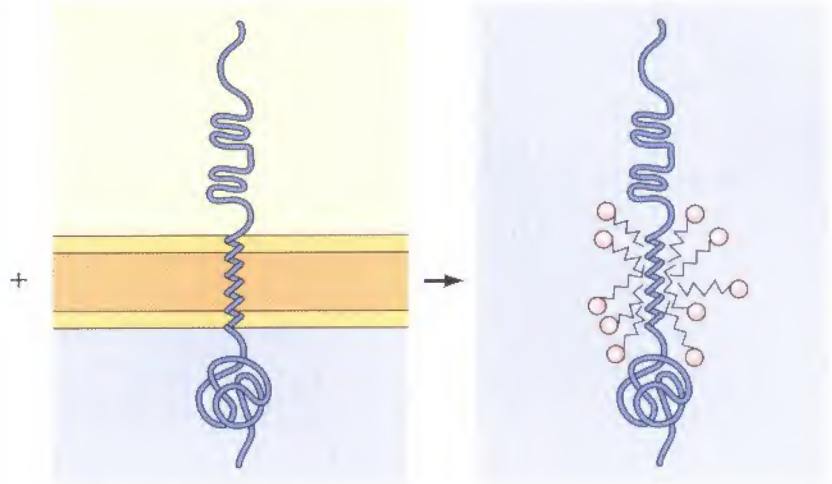



*Figura 12.4*
**Solubilización de las proteínas integrales de membrana mediante detergentes.** Los detergentes (p. ej., octil glucósido) son moléculas anfipáticas que contienen cabezas hidrofílicas y colas hidrofóbicas. Las colas hidrofóbicas se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana, formando un complejo detergente-proteína que es soluble en solución acuosa.

A diferencia de las proteínas periféricas de membrana, las proteínas integrales de membrana solamente pueden ser liberadas mediante tratamientos que rompan la bicapa fosfolipídica. Estas proteínas integrales de membrana tienen partes que se insertan dentro de la bicapa lipídica, por lo que sólo pueden ser disociadas mediante agentes que alteren las interacciones hidrofóbicas. Los agentes más comunes utilizados para la solubilización de las proteínas integrales de membrana son los detergentes, que son moléculas pequeñas anfipáticas que contienen tanto grupos hidrofóbicos como hidrofílicos (Fig. 12.4). Las porciones hidrofóbicas de los detergentes desplazan los lípidos de membrana y se unen a las porciones hidrofóbicas de las proteínas integrales de membrana. Debido a que el otro extremo de la molécula de detergente es hidrofílico, los complejos detergente-proteína son solubles en soluciones acuosas.

Muchas proteínas integrales son **proteínas transmembrana**, que atraviesan la bicapa lipídica con partes expuestas a ambos lados de la membrana. Estas proteínas se pueden observar en las micrografías electrónicas de las membranas plasmáticas preparadas mediante la técnica de criofractura (véase Fig. 1.35). En estas muestras, la membrana se encuentra partida y separada en sus dos capas. Las proteínas transmembrana aparecen entonces como partículas sobre la cara interna de la membrana (Fig. 12.5).

La porción de las proteínas transmembrana que atraviesa la membrana son generalmente $\alpha$-hélices de 20 a 25 aminoácidos hidrofóbicos que se insertan dentro de la membrana del retículo endoplasmático durante la síntesis de la cadena polipeptídica (véanse Figs. 9.11, 9.12, y 9.13). Estas proteínas entonces se transportan en vesículas de membrana desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, y desde allí a la membrana plasmática. A las cadenas polipeptídicas se les añaden grupos carbohidrato, tanto en el retículo endoplasmático como en el aparato de Golgi, por lo que la mayoría de las proteínas transmembrana de la membrana plasmática son glicoproteínas con sus oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.

Los estudios en glóbulos rojos han proporcionado buenos ejemplos de proteínas periféricas e integrales asociadas con la membrana plasmática. Las membranas de los eritrocitos humanos contienen cerca de una docena de proteínas principales, que se identificaron originalmente mediante electroforesis en gel de preparaciones de mem-

*Figura 12.5*
**Micrografía electrónica de criofractura de membranas de glóbulos rojos sanguíneos humanos** Las partículas en la membrana son proteínas transmembrana. (Harold H. Edwards/ Visuals Unlimited.)



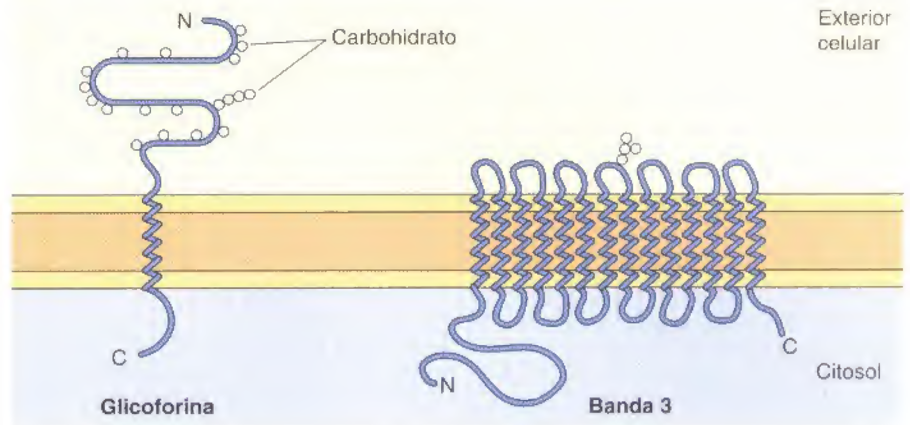



*Figura 12.6*
**Proteínas integrales de membrana de glóbulos rojos sanguíneos.** La glicoforina (131 aminoácidos) contiene una única α-hélice transmembrana. Está muy glicosilada, con 16 sitios de unión para los oligosacáridos en la porción extracelular de la cadena polipeptídica. La banda 3 (929 aminoácidos) tiene múltiples α-hélices transmembrana y se cree que atraviesa la membrana 14 veces.

brana. La mayor parte de éstas son proteínas periféricas de membrana que se han identificado como componentes del citoesqueleto cortical, que subyace a la membrana plasmática y determina la forma celular (véase Cap. 11). Por ejemplo, la proteína periférica de membrana más abundante de los glóbulos rojos es la espectrina, que es la principal proteína del citoesqueleto de los eritrocitos. Otras proteínas periféricas de membrana de los glóbulos rojos son la actina, la anquirina, y la banda 4.1. La anquirina es el principal puente de unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, uniéndose a la espectrina y a la proteína integral de membrana banda 3 (véase Fig. 11.11). Un nexo adicional entre la membrana y el citoesqueleto lo proporciona la banda 4.1, que se fija a las uniones de espectrina y actina, así como a la glicoforina (la otra proteína integral de membrana importante de los eritrocitos).

Las dos proteínas integrales de membrana principales de los glóbulos rojos, glicoforina y banda 3, proporcionan ejemplos bien estudiados de la estructura de las proteínas transmembrana (Fig. 12.6). La glicoforina es una glicoproteína pequeña de 131 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 30.000, del cual la mitad corresponde a la fracción de proteínas y la otra mitad a carbohidrato. La glicoforina atraviesa la membrana mediante una única α-hélice de 23 aminoácidos y la porción aminoterminal está glicosilada y expuesta en la superficie celular. Aunque la glicoforina fue una de las primeras proteínas transmembrana que se caracterizaron todavía se desconoce su función exacta. Por el contrario, si que se conoce la función de la otra proteína transmembrana principal de los glóbulos rojos. Esta proteína, originariamente conocida como banda 3, es el transportador aniónico responsable del transporte de iones bicarbonato ($HCO_3^-$) y cloruro ($Cl^-$) a través de la membrana del glóbulo rojo. La cadena polipeptídica de la banda 3 consta de 929 aminoácidos y se cree que tiene 14 regiones en α-hélice que atraviesan la membrana. Dentro de la membrana, dímeros de la banda 3 forman estructuras globulares que contienen canales internos a través de los cuales los iones son capaces de cruzar la bicapa lipídica.

Debido a su carácter anfipático es muy difícil conseguir que las proteínas transmembrana cristalicen, como se requiere para un análisis estructural tridimensional por difracción de rayos X. La primera proteína transmembrana en ser analizada por cristalografía de rayos X fue el centro de reacción fotosintético de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis*, cuya estructura fue publicada en 1985 (Fig. 12.7). El centro de reacción está constituido por tres proteínas transmembrana, designadas por L, M, y H, (del inglés *light*, *medium*, y *heavy*, ligera, media y pesada, respectivamente) en función de su tamaño aparente indicado por electroforesis en gel. Las subunidades L y M tienen cada una cinco α-hélices que atraviesan la membrana. La subunidad H tiene únicamente una α-hélice transmembrana y la mayor parte de la cadena polipeptídica se dispone sobre el lado citosólico de la membrana. La cuarta subunidad del centro de reacción es

un citocromo, que es una proteína periférica de membrana unida al complejo mediante interacciones proteína-proteína.

Aunque la mayoría de las proteínas transmembrana atraviesan la membrana mediante regiones de α-hélice, esto no siempre es así. Una excepción bien conocida la proporcionan las **porinas** —una clase de proteínas que forman canales en las membranas externas de algunas bacterias—. Muchas bacterias, incluyendo *E. coli*, tienen un sistema doble de membranas en el que la membrana plasmática (o membrana interna) se encuentra rodeada por la pared celular y por una membrana externa diferenciada (Fig. 12.8). A diferencia de la membrana plasmática, la membrana externa es muy permeable a los iones y a las moléculas pequeñas polares (en el caso de *E. coli*, con pesos moleculares de hasta 600). Esta permeabilidad es debida a las porinas, que forman canales acuosos abiertos a través de la bicapa lipídica. Como se describió en el Capítulo 10, también se encuentran proteínas relacionadas con las porinas bacterianas en las membranas externas de las mitocondrias y de los cloroplastos.

El análisis estructural muestra que las porinas no contienen regiones α-hélice hidrofóbicas. En su lugar, atraviesan la membrana en forma de barriles β, en los que 8 a 22 láminas β se pliegan para formar una estructura con forma de barril que encierra un poro acuoso. Las cadenas laterales de los aminoácidos polares revisten el poro, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos interaccionan con el interior de la membrana. Algunas porinas están presentes en la membrana en forma de monómeros, mientras que otras se asocian para formar multímeros estables, formando múltiples canales a través de los cuales pueden difundir moléculas polares a través de la membrana.

A diferencia de las proteínas transmembrana, otros tipos de proteínas (muchas de las cuales se comportan como proteínas integrales de membrana) se unen a la membrana plasmática por uniones covalentes a lípidos o a glicolípidos (Fig. 12.9). Una clase de estas proteínas se unen a la capa externa de la membrana plasmática mediante **anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI)**. Los anclajes de GPI se añaden a determinadas proteínas que se transfieren al retículo endoplasmático y que se unen a la membrana por una región C-terminal transmembrana (véase Fig. 9.16). El fragmento transmembrana se escinde cuando se añade el anclaje de GPI, por lo que estas proteínas permanecen unidas a la

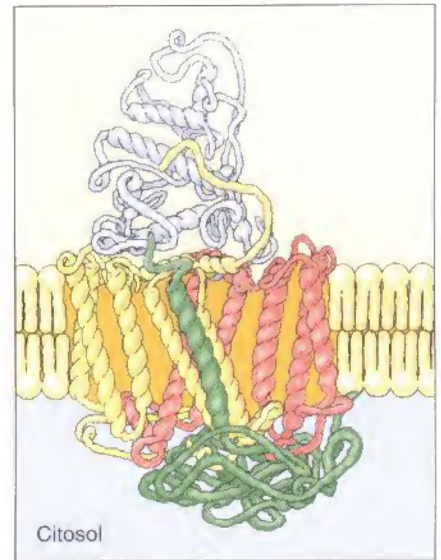



*Figura 12.7*
**Centro de reacción fotosintético de una bacteria.** El centro de reacción consta de tres proteínas transmembrana, denominadas L (roja), M (amarilla) y H (verde). Las subunidades L y M cada una tiene cinco α-hélices transmembrana, mientras que la subunidad H solamente tiene una. La cuarta subunidad del centro de reacción es un citocromo (blanco), que es una proteína periférica de membrana.

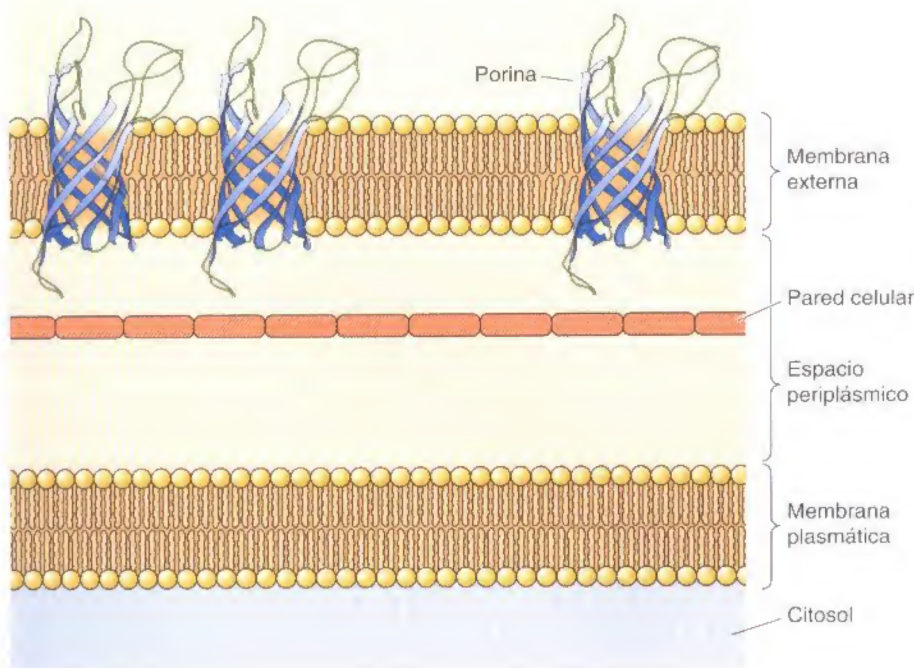



*Figura 12.8*
**Membranas externas bacterianas.** La membrana plasmática de algunas bacterias está rodeada por una pared celular con una membrana externa diferenciada. La membrana externa contiene porinas, que forman canales acuosos que permiten la libre circulación de iones y moléculas pequeñas. Las porinas atraviesan la membrana en forma de barriles β.

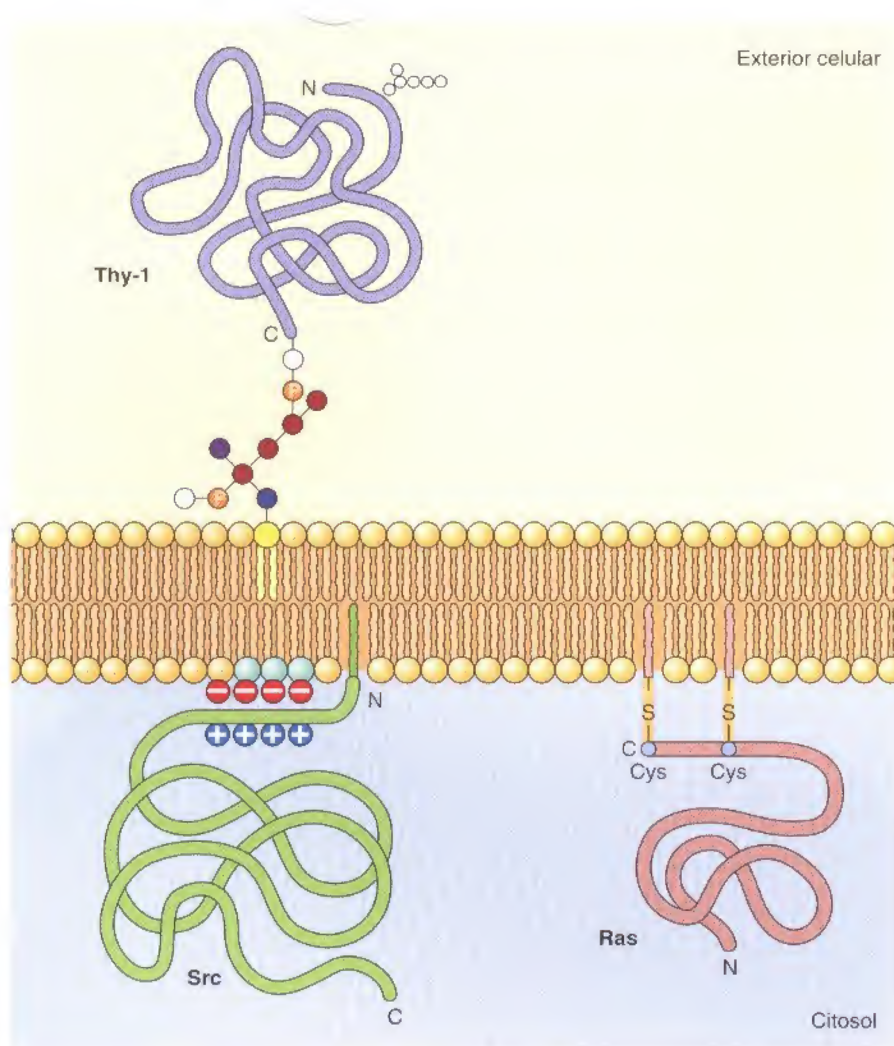



*Figura 12.9*
**Ejemplos de proteínas unidas a la membrana plasmática mediante lípidos y glicolípidos.** Algunas proteínas (p. ej., la proteína linfocitaria Thy-1) se unen a la capa externa de la membrana plasmática mediante anclajes de GPI que se añaden a su C-terminal en el retículo endoplásmico. Estas proteínas son glicosiladas y expuestas en la superficie celular. Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática tras ser traducidas por los ribosomas citosólicos libres. La proteína Ras, que aquí se muestra, se une por un grupo prenilo fijado a la cadena lateral de una cisteína C-terminal y por un grupo palmitoilo unido a una cisteína localizada cinco aminoácidos más adelante. La proteína Src se une a través de un grupo miristoilo unido a su N-terminal. Una región de Src con carga positiva también desempeña un papel en la asociación a la membrana, quizás por interactuar con las cabezas con carga negativa de la fosfatidilserina. Las estructuras de estos grupos lipídicos y glicolipídicos se muestran desde la Figura 7.31 a la 7.34.

membrana solamente por el glicolípido. Puesto que las cadenas polipeptídicas de las proteínas ancladas mediante GPI se transfieren al retículo endoplasmático, son glicosiladas y expuestas en la superficie de la célula tras ser transportadas a la membrana plasmática.

Otras proteínas se unen a la capa interna de la membrana plasmática a través de lípidos asociados por enlace covalente. Estas proteínas, en vez de ser procesadas a través de la vía secretora, se sintetizan en ribosomas citosólicos libres y son modificadas después por la adición de lípidos. Estas modificaciones incluyen la adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al amino terminal de la cadena polipeptídica, la adición de ácido palmítico (16 carbonos) a las cadenas laterales de restos de cisteína, y la adición de grupos prenilo (15 o 20 carbonos) a las cadenas laterales de los restos de cisteína carboxilo terminales (véanse Figs. 7.31, 7.32, y 7.33). En algunos casos, el destino en la membrana de estas proteínas (muchas de las cuales se comportan como proteínas periféricas de membrana) está marcado, además de por la unión de los lípidos, por regiones de la cadena polipeptídica cargadas positivamente. Estos dominios de proteínas con carga positiva pueden interaccionar con los grupos cargados negativamente de la cabeza de la fosfatidilserina en la cara citosólica de la membrana plasmática. Hay que destacar que muchas de las proteínas unidas a la capa interna de la membrana plasmática (incluyendo las proteínas Src y Ras mostradas en la Fig. 12.9) desempeñan un papel importante en la transmisión de señales desde los receptores de superficie celulares a las dianas intracelulares, como se verá en el próximo capítulo.

## *Movilidad de las proteínas de la membrana*

Las proteínas de la membrana y los fosfolípidos no pueden saltar hacia adelante y hacia atrás entre las capas interna y externa de la membrana a una velocidad apreciable. Sin embargo, debido a que se insertan en una bicapa lipídica fluida, tanto las proteínas como los lípidos son capaces de difundirse lateralmente a través de la membrana. Este movimiento lateral se mostró por primera vez de forma directa en un experimento publicado por Larry Frye y Michael Edidin en 1970, que supuso un apoyo al modelo del mosaico fluido. Frye y Edidin fusionaron células humanas y de ratón en un cultivo para obtener células híbridas ratón-humanas (Fig. 12.10). Analizaron después la distribución de las proteínas en las membranas de estas células híbridas empleando anticuerpos que reconocían específicamente las proteínas de origen humano y de ratón. Estos anticuerpos se marcaron con distintos tintes fluorescentes, por lo que las

proteínas humana y de ratón podían distinguirse por microscopía de fluorescencia. Inmediatamente después de la fusión, las proteínas de hombre y de ratón se localizaron en mitades diferentes de las células híbridas. Sin embargo, después de un breve periodo de incubación a 37° C, las proteínas de hombre y de ratón se encontraban totalmente mezcladas sobre la superficie celular, lo que indicaba que se movían libremente a través de la membrana plasmática.

Sin embargo, no todas las proteínas son capaces de difundir libremente por la membrana. En algunos casos, la movilidad de las proteínas de membrana se encuentra restringida por su asociación con el citoesqueleto. Por ejemplo, una fracción de la banda 3 en la membrana de los glóbulos rojos está inmovilizada debido a su unión con la anquirina y la espectrina. En otros casos, la movilidad de las proteínas de membrana puede estar restringida por su asociación con otras proteínas de membrana, con proteínas de la superficie de células adyacentes, o con la matriz extracelular.

A diferencia de los glóbulos rojos, las células epiteliales se polarizan cuando están organizadas en tejidos, de tal manera que diferentes partes de la célula llevan a cabo distintas funciones. Por lo tanto, las membranas plasmáticas de muchas células epiteliales se dividen en los **dominios apical** y **basolateral** que difieren en función y en composición de proteínas (Fig. 12.11). Por ejemplo, las células epiteliales del intestino delgado actúan absorbiendo nutrientes desde el tracto digestivo. La superficie apical de estas células, que encara la luz intestinal, está cubierta por microvellosidades y especializada en la absorción de nutrientes. La superficie basolateral, que encara al tejido conectivo subyacente y al aporte sanguíneo, está especializada en la transferencia hacia la circulación de los nutrientes absorbidos. Para mantener estas funciones diferenciadas, la movilidad de las proteínas de la membrana plasmática debe estar restringida a los dominios pertinentes de la superficie celular. Uno de los mecanismos por el que esto tiene lugar implica la formación de uniones estrechas (que se tratan más adelante en este Capítulo) entre las células adyacentes del epitelio. Estas uniones no sólo sellan el espacio entre las células sino que también sirven como

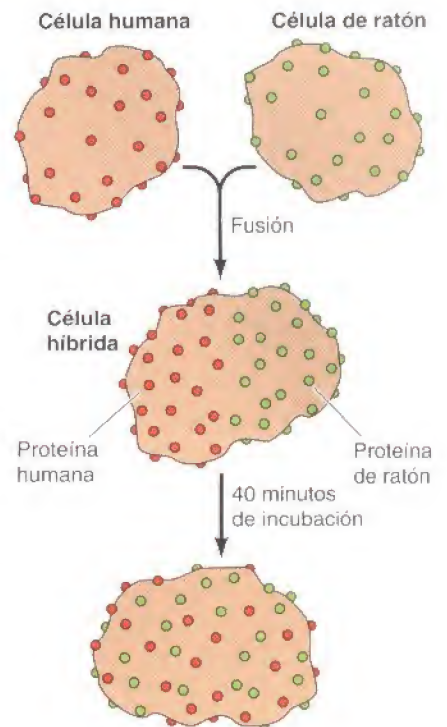



*Figura 12.10*
**Movilidad de las proteínas de la membrana.** Se fusionaron células de hombre y de ratón para obtener células híbridas. La distribución de las proteínas en la superficie celular se analizó utilizando anticuerpos anti-humano y anti-ratón marcados con diferentes tintes fluorescentes (rojo y verde, respectivamente). Las proteínas de hombre y de ratón se detectaron en diferentes mitades de las células híbridas inmediatamente después de la fusión, pero tras cuarenta minutos de incubación se habían entremezclado en la superficie celular.

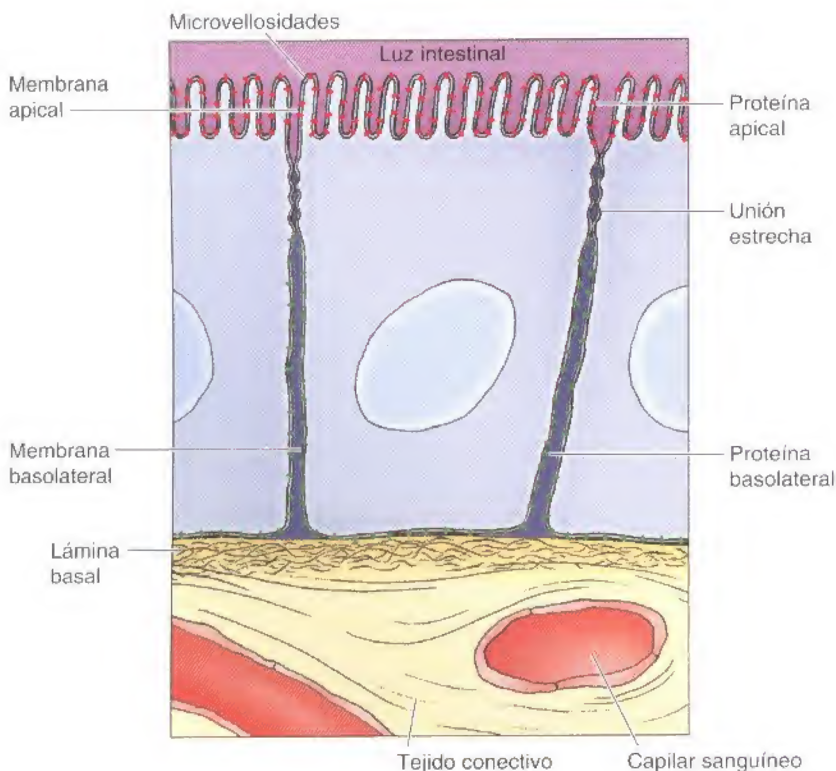



*Figura 12.11*
**Célula epitelial intestinal polarizada.** La superficie apical de la célula contiene microvellosidades y está especializada en la absorción de nutrientes desde la luz intestinal. La superficie basolateral está especializada en la transferencia de los nutrientes absorbidos al tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Las proteínas de membrana se difunden libremente dentro de cada dominio, pero no son capaces de cruzar de un dominio al otro.

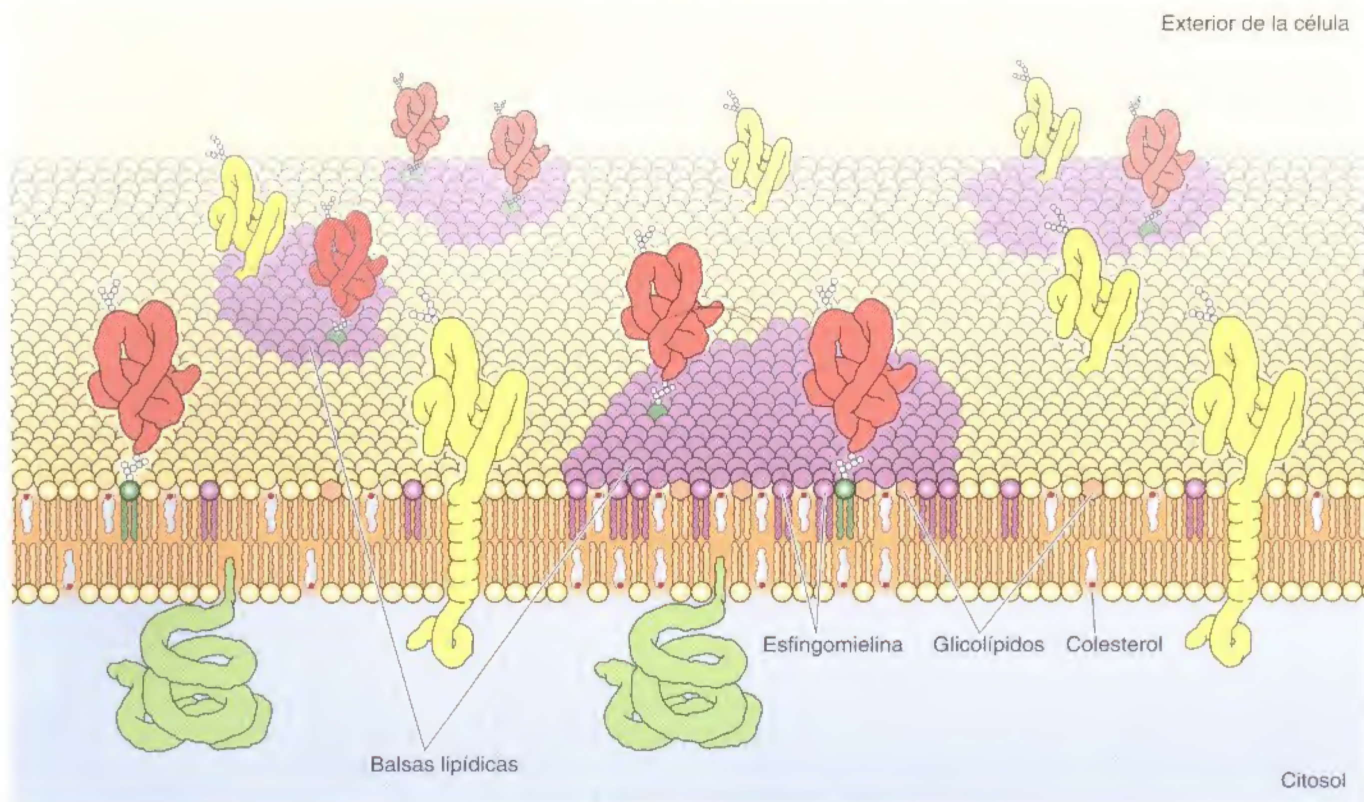



*Figura 12.12*
**Estructura de las balsas lipídicas.** Las balsas lipídicas están organizadas por interacciones entre la esfingomielina, los glicolípidos y el colesterol. Las proteínas ancladas a GPI se encuentran preferentemente en las balsas lipídicas y muchos otros tipos de proteínas de membrana también están presentes de forma transitoria, para mediar la señalización celular o la endocitosis.

barreras para el movimiento de los lípidos y proteínas de membrana. Como resultado, las proteínas son capaces de difundir tanto dentro del dominio apical como del basolateral de la membrana plasmática pero no son capaces de cruzar de un dominio a otro.

La composición lipídica también puede perturbar la libre difusión de las proteínas de membrana. Las temperaturas de fusión de los esfingolípidos (esfingomielina y glicolípidos) difieren de las de los fosfolípidos derivados del glicerol. La esfingomielina y los glicolípidos tienden a agruparse en pequeñas zonas semisólidas denominadas **balsas lipídicas** (*lipid rafts*), que también están enriquecidas en colesterol debido a la afinidad de empaquetamiento del colesterol y los esfingolípidos (Fig. 12.12). Las balsas también están enriquecidas en proteínas ancladas a GPI, y diversas proteínas que se encuentran en la bicapa de fosfolípidos, como proteínas de unión a GTP y diversas proteínas quinasas, entran y salen de las balsas. La presencia transitoria de estas proteínas en las balsas, permite la agrupación necesaria para procesos como la endocitosis y la señalización mediada por receptores.

Algunas balsas están estabilizadas por interacciones con el citoesqueleto a través de proteínas periféricas de membrana. Una proteína periférica de este tipo es la caveolina, que se asocia a una subclase de balsas lipídicas denominadas caveolas. Como se verá más adelante en este capítulo, las caveolas se asocian específicamente con la endocitosis.

## Glicocálix

Como ya se ha visto, las porciones extracelulares de las proteínas de la membrana plasmática generalmente se encuentran glicosiladas. Del mismo modo, las fracciones hidrocarbonadas de los glicolípidos se exponen en la cara externa de la membrana plasmática. Como consecuencia, la superficie de la célula está cubierta de un manto de carbohidratos, conocido como el **glicocálix**, cons-




*Figura 12.13*
**Glicocálix.** Micrografía electrónica de epitelio intestinal mostrándose el glicocálix (flechas). (Don Fawcett/Visuals Unlimited.)

tituido por los oligosacáridos de los glicolípidos y de las glicoproteínas transmembrana (Fig. 12.13).

Una de las funciones del glicocálix es proteger la superficie celular. Además, los oligosacáridos del glicocálix sirven como marcadores de varios tipos de interacciones célula-célula. Un ejemplo bien estudiado de estas interacciones es la adhesión de los glóbulos blancos sanguíneos (leucocitos) a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos —proceso que permite a los leucocitos abandonar el sistema circulatorio e intervenir en la respuesta inflamatoria en los tejidos dañados—. El primer paso en la adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales está mediado por una familia de proteínas transmembrana denominadas **selectinas**, que reconocen carbohidratos específicos de la superficie celular (Fig. 12.14). Dos miembros de la familia de las selectinas (E-selectina y P-selectina), que se expresan en las células endoteliales y en las plaquetas, se unen a oligosacáridos específicos expresados en la superficie de los leucocitos. Una selectina diferente (L-selectina) se expresa en los leucocitos y reconoce un oligosacárido en la superficie de las células endoteliales. Por lo tanto, los oligosacáridos expuestos en la superficie celular proporcionan un conjunto de marcadores que ayudan a identificar los distintos tipos de células de los organismos pluricelulares.

## Transporte de moléculas pequeñas

La célula mantiene su composición interna debido a que la membrana plasmática es selectivamente permeable a las moléculas pequeñas. La mayoría de las moléculas biológicas es incapaz de difundir a través de la bicapa fosfolipídica, por lo que la membrana plasmática constituye una barrera que impide el libre intercambio de moléculas entre el cito-



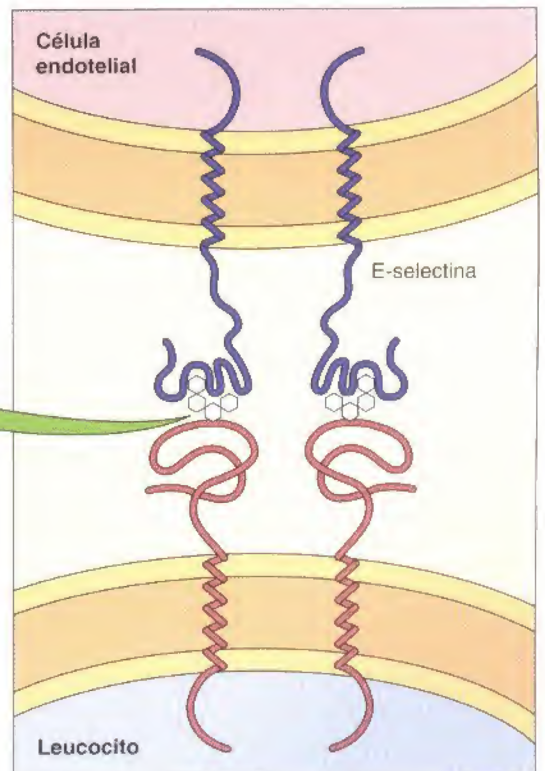




*Figura 12.14*
**Unión de las selectinas a los oligosacáridos.** La E-selectina es una proteína transmembrana que se expresa en las células endoteliales y que se une a un oligosacárido expresado sobre la superficie de los leucocitos. El oligosacárido reconocido por la E-selectina contiene *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), galactosa (Gal) y ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NANA).

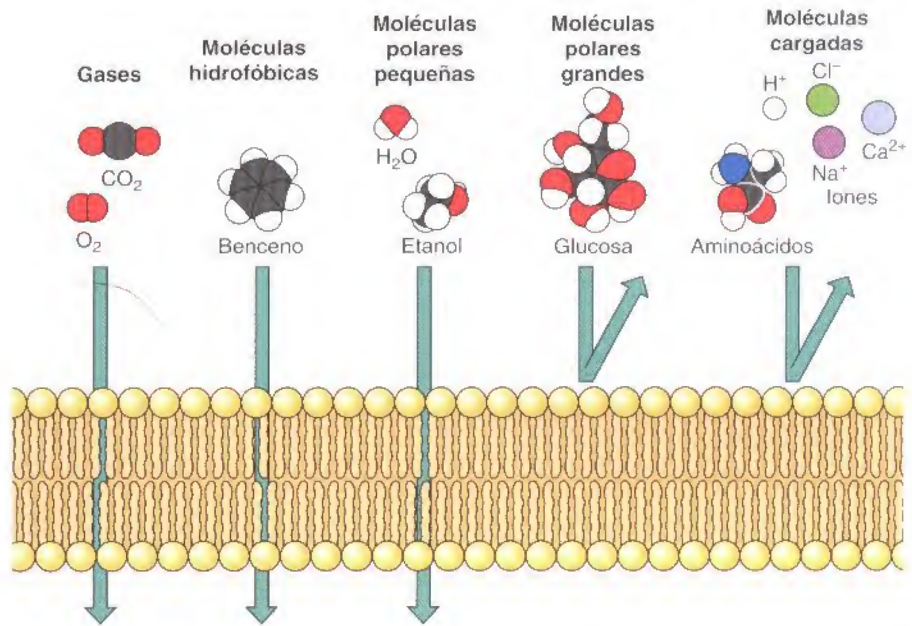



*Figura 12.15*
**Permeabilidad de las bicapas fosfolipídicas.** Los gases, las moléculas hidrofóbicas y las pequeñas moléculas polares sin carga pueden difundir a través de las bicapas fosfolipídicas. No pueden hacerlo las moléculas polares más grandes ni las moléculas cargadas.

plasma y el medio externo de la célula. Son las proteínas de transporte específicas (proteínas transportadoras *carriers* y las proteínas de canal) las responsables del tránsito selectivo de las moléculas pequeñas a través de la membrana, permitiendo a la célula controlar la composición de su citoplasma.

## *Difusión pasiva*

El mecanismo más sencillo mediante el que las moléculas pueden atravesar la membrana plasmática es la **difusión pasiva**. En la difusión pasiva una molécula se disuelve en la bicapa fosfolipídica, difunde a través de ella, y después se disuelve en la solución acuosa al otro lado de la membrana. No interviene ninguna proteína de membrana y la dirección del transporte viene determinada simplemente por las concentraciones relativas de la molécula dentro y fuera de la célula. El flujo neto de las moléculas se produce a favor de su gradiente de concentración —desde un compartimento con una concentración elevada de la molécula a otro con una concentración inferior—.

Por lo tanto, la difusión pasiva es un proceso no selectivo por el que cualquier molécula capaz de disolverse en la bicapa fosfolipídica es capaz de atravesar la membrana plasmática y alcanzar el equilibrio entre el interior y el exterior celular. Es importante señalar que sólo las moléculas pequeñas y relativamente hidrofóbicas son capaces de difundir a través de la bicapa fosfolipídica a una velocidad significativa (Fig. 12.15). De esta manera, los gases (como el $O_2$ y el $CO_2$), las moléculas hidrofóbicas (como el benceno), y las moléculas pequeñas polares pero sin carga (como el $H_2O$ y el etanol) son capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Sin embargo, otras moléculas biológicas son incapaces de disolverse en el interior hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. Debido a esto, las moléculas polares grandes no cargadas, como la glucosa, son incapaces de atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, al igual que tampoco lo pueden hacer las moléculas cargadas, independientemente del tamaño (incluyendo iones pequeños como $H^+$, $Na^+$, $K^+$, y $Cl^-$). El transporte de estas moléculas a través de la membrana requiere la participación de proteínas de canal y transportadores específicos que de esta forma controlarán el tráfico de la mayoría de las moléculas biológicas dentro y fuera de la célula.

## *Difusión facilitada y proteínas transportadoras*

La **difusión facilitada**, al igual que la difusión pasiva, implica el movimiento de las moléculas en la dirección determinada por sus concentraciones relativas

dentro y fuera de la célula. No interviene ninguna fuente de energía externa, por lo que las moléculas se desplazan a través de la membrana en la dirección determinada por sus gradientes de concentración y, en el caso de las moléculas cargadas, por el potencial eléctrico a través de la membrana. Sin embargo, la difusión facilitada se diferencia de la difusión pasiva en que las moléculas transportadas no se disuelven en la bicapa fosfolipídica. En su lugar, su tránsito viene mediado por proteínas que permiten a las moléculas transportadas atravesar la membrana sin interaccionar directamente con su interior hidrofóbico. Por lo tanto, la difusión facilitada permite a las moléculas cargadas y a las polares, como carbohidratos, aminoácidos, nucleósidos, e iones, atravesar la membrana plasmática.

Se suelen distinguir dos clases de proteínas que intervienen en la difusión facilitada: proteínas transportadoras y proteínas de canal. Las **proteínas transportadoras** se unen, en un lado de la membrana, a las moléculas específicas que han de ser transportadas. Después sufren un cambio conformacional que permite que la molécula pase a través de la membrana y sea liberada al otro lado. En cambio, las **proteínas de canal** (descritas en la sección siguiente) forman poros abiertos a través de la membrana y permiten la libre difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados.

Las proteínas transportadoras son las responsables de la difusión facilitada de los azúcares, aminoácidos, y nucleósidos, a través de la membrana plasmática de la mayoría de las células. La entrada de la glucosa, que es la fuente principal de energía metabólica, es una de las funciones de transporte más importantes de la membrana plasmática, y el transportador de glucosa proporciona un ejemplo bien estudiado de una proteína transportadora. El transportador de glucosa se identificó inicialmente como una proteína de 55-kDa en los glóbulos rojos sanguíneos humanos, donde representa aproximadamente el 5 % de la proteína total de la membrana. El aislamiento y el análisis posterior de la secuencia de un clon de ADNc revelaron que el transportador de glucosa presenta 12 segmentos transmembrana en $\alpha$-hélice —una estructura típica de muchas proteínas transportadoras (Fig. 12.16). Estas $\alpha$-hélices transmembrana están compuestas, fundamentalmente, por aminoácidos hidrofóbicos pero varias también contienen restos aminoacídicos polares que se cree que forman parte del sitio de unión de la glucosa en el interior de la proteína.

Al igual que sucede con muchas proteínas de membrana, no se conoce la estructura tridimensional del transportador de la glucosa, por lo que el mecanismo molecular del transporte de la glucosa es una incógnita. Sin embargo, los estudios cinéticos indican que el transportador de la glucosa funciona alternando entre dos

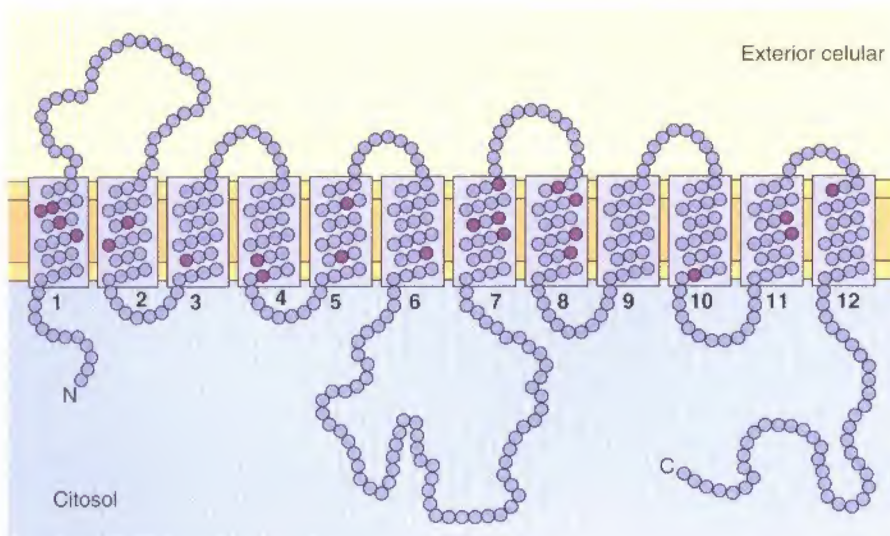



*Figura 12.16*
**Estructura del transportador de la glucosa.** El transportador de la glucosa tiene 12 $\alpha$-hélices transmembrana. Los restos aminoacídicos polares situados dentro de la bicapa fosfolipídica vienen indicados como círculos morado oscuro. (Adaptado de G. I. Bell, C. F. Burant, J. Takeda y G. W. Gould, 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 19161.)

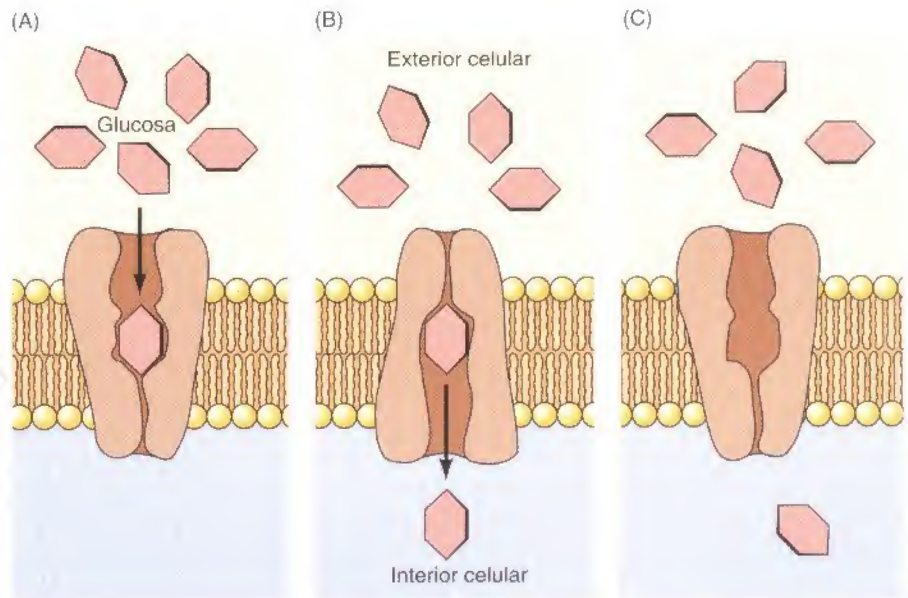



*Figura 12.17*
**Modelo para la difusión facilitada de la glucosa.** El transportador de la glucosa alterna entre dos conformaciones en donde el sitio de unión de la glucosa se encuentra alternativamente expuesto al exterior y al interior celular. En la primera conformación mostrada (A), la glucosa se fija al sitio expuesto al exterior de la membrana plasmática. El transportador entonces sufre un cambio conformacional, de manera que el sitio de unión de la glucosa encara al interior de la célula y la glucosa se libera al citosol (B). Entonces, el transportador recupera su conformación original (C).

conformaciones (Fig. 12.17). En la primera conformación, el sitio de unión a la glucosa se sitúa frente al exterior de la célula. La unión de la glucosa a este sitio induce un cambio conformacional en el transportador, de tal manera que el sitio de unión de la glucosa ahora se sitúa frente al interior celular. Entonces la glucosa puede ser liberada en el citosol y el transportador recupera su conformación inicial.

La mayoría de las células, incluyendo los eritrocitos, están expuestas a concentraciones de glucosa extracelulares más altas que las existentes en el interior de la célula, por lo que la difusión facilitada da lugar a un flujo neto de la glucosa hacia el interior. Una vez que la glucosa es captada por estas células, se metaboliza rápidamente por lo que la concentración intracelular de glucosa permanece baja y la glucosa se sigue transportando hacia el interior celular desde el fluido extracelular. Sin embargo, debido a que los cambios conformacionales en el transportador de glucosa son reversibles, la glucosa puede ser transportada en la dirección opuesta simplemente invirtiendo los pasos de la Figura 12.17. Ese flujo inverso ocurre, por ejemplo, en las células hepáticas, en donde la glucosa se sintetiza y se libera a la circulación.

## *Canales iónicos*

A diferencia de las proteínas transportadoras, las proteínas de canal simplemente forman poros abiertos en la membrana, permitiendo a las moléculas de pequeño tamaño y carga apropiada pasar libremente a través de la bicapa lipídica. Un grupo de proteínas de canal descritas anteriormente son las porinas, que permiten el libre tránsito de iones y moléculas polares pequeñas a través de las membranas externas de las bacterias (véase Fig. 12.8). Las proteínas de canal también permiten el paso de moléculas entre las células conectadas entre sí mediante uniones de tipo «gap», que se tratarán posteriormente en el capítulo. Las membranas plasmáticas de muchas células también contienen proteínas de canal para el agua (acuaporinas), a través de las cuales las moléculas de agua pueden cruzar la membrana mucho más rápidamente de lo que pueden difundir a través de la bicapa fosfolipídica. Sin embargo, las proteínas de canal mejor caracterizadas son los **canales iónicos**, que intervienen en el tránsito de los iones a través de la membrana plasmática. Aunque los canales iónicos están presentes en las membranas de todas las células, han sido especialmente bien estudiados en el nervio y en el músculo, donde su apertura y cierre regulados son los responsable de la transmisión de las señales eléctricas.

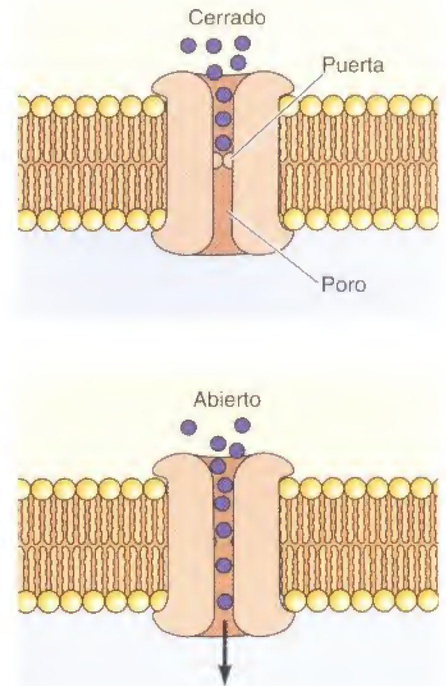



*Figura 12.18*
**Modelo de un canal iónico.** En la conformación cerrada, el flujo de los iones está bloqueado por una puerta. La apertura de la puerta permite a los iones fluir rápidamente a través del canal. El canal contiene un poro estrecho que restringe el tránsito a los iones del tamaño y carga apropiados.

Tres propiedades de los canales iónicos son fundamentales para su función (Fig. 12.18). En primer lugar, el transporte a través de los canales es extremadamente rápido. Más de un millón de iones por segundo fluyen a través de los canales abiertos —una velocidad de flujo aproximadamente mil veces mayor que la velocidad de transporte mediante proteínas transportadoras. En segundo lugar, los canales iónicos son altamente selectivos debido a que el estrecho poro del canal restringe el paso a aquellos iones de un tamaño y carga apropiados. De esta manera, proteínas de canal específicas permiten el tránsito de $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$, y $Cl^-$ a través de la membrana. En tercer lugar, la mayoría de los canales iónicos no se encuentran permanentemente abiertos. En su lugar, la apertura de los canales iónicos viene regulada por «puertas» que se abren de forma transitoria en respuesta a estímulos específicos. Algunos canales (denominados **canales regulados por ligando**) se abren en respuesta a la unión de neurotransmisores u otras moléculas señal; otros (denominados **canales regulados por voltaje**) se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

El papel fundamental que desempeñan los canales iónicos en la transmisión de los impulsos eléctricos fue elucidado a través de una serie de elegantes experimentos publicados por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1952. Estos investigadores emplearon como modelo las células nerviosas gigantes del calamar. Los axones de estas neuronas gigantes tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm, lo que hace posible la inserción de electrodos y la medida de la variación en el potencial de membrana que tiene lugar durante la transmisión de los impulsos nerviosos. Mediante este abordaje, Hodgkin y Huxley demostraron que los cambios en el potencial de membrana se debían a la apertura y cierre regulados de los canales de $Na^+$ y $K^+$ en la membrana plasmática. Posteriormente se pudo estudiar la actividad de los canales iónicos individuales empleando la ***técnica de patch clamp*** (o «técnica de registro de zona») desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 (Fig. 12.19). En este método, se emplea una micropipeta con un diámetro en la punta de aproximadamente 1 $\mu$m para aislar un pequeño trozo de la membrana; esto permite analizar el flujo de los iones a través de un único canal y estudiar con mayor precisión la actividad de los canales iónicos.

El flujo de los iones a través de los canales de membrana depende de que se forme un gradiente iónico a través de la membrana plasmática. Todas las células, incluyendo las células nerviosas y las musculares, tienen bombas iónicas (que se describirán en la siguiente sección) que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para realizar un transporte activo de iones a través de la membrana plasmática. El resultado es que la composición iónica del citoplasma es sensiblemente diferente a la del fluido extracelular (Tabla 12.1). Por ejemplo, el $Na^+$ es bombeado activamente fuera de las células mientras que el $K^+$ es bombeado hacia dentro. Debido a esto, en el axón de calamar la concentración de $Na^+$ es casi 10 veces más alta en el fluido extracelular que dentro de la célula, mientras que la concentración de $K^+$ es aproximadamente 20 veces mayor en el citosol que en el medio circundante.

Debido a que los iones están cargados eléctricamente, su transporte supone que se establezca un gradiente eléctrico a través de la membrana. En el axón en

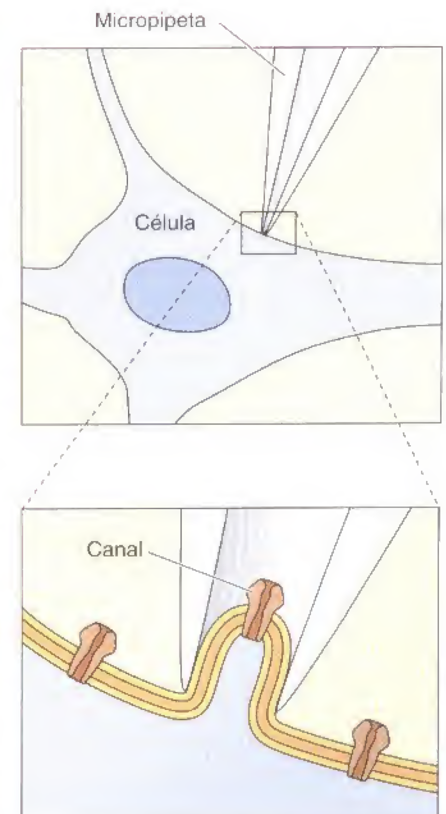



*Figura 12.19*
**Técnica de *patch-clamp* (o de registro de zona).** Se aísla un pequeño trozo de membrana en la punta de una micropipeta. Entonces se puede aplicar un estímulo desde dentro de la pipeta, lo que permite medir el comportamiento del canal atrapado. (Adaptado de E. Neher y B. Sakmann, 1992. *Sci. Am.* 266(3): 44.)

**TABLA 12.1.** Concentraciones iónicas extracelulares e intracelulares

| Ión | Concentración (m*M*) Intracelular | Extracelular |
|---|---|---|
| **Axón de calamar** | | |
| $K^+$ | 400 | 20 |
| $Na^+$ | 50 | 450 |
| $Cl^-$ | 40-150 | 560 |
| $Ca^{2+}$ | 0,0001 | 10 |
| **Célula de mamífero** | | |
| $K^+$ | 140 | 5 |
| $Na^+$ | 5-15 | 145 |
| $Cl^-$ | 4 | 110 |
| $Ca^{2+}$ | 0,0001 | 2,5-5 |

reposo del calamar hay un potencial eléctrico de aproximadamente 60 mV a través de la membrana plasmática, siendo el interior de la célula negativo con respecto al exterior celular (Fig. 12.20). Este potencial eléctrico se debe a las bombas iónicas y al flujo de los iones a través de los canales que estén abiertos en la membrana plasmática de la célula en reposo. La membrana plasmática de los axones en reposo de calamar contiene canales de $K^+$ abiertos, por lo que es más permeable al $K^+$ que al $Na^+$ o a otros iones. Como consecuencia, el flujo de $K^+$ supone la principal aportación al potencial de membrana en reposo.

Como se describió en el Capítulo 10, el flujo de los iones a través de la membrana está dirigido tanto por el componente de la concentración como por el componente del voltaje de un gradiente electroquímico. Por ejemplo, la concentración 20 veces superior de $K^+$ en el interior del axón de calamar, en comparación con la del fluido extracelular, dirige el flujo de $K^+$ hacia el exterior celular. Sin embargo, debido a que el $K^+$ se encuentra cargado positivamente, este flujo de $K^+$ desde la célula genera un potencial eléctrico a través de la membrana encontrándose el interior de la célula cargado negativamente. Este potencial de membrana se opone al flujo continuo de $K^+$ hacia el exterior de la célula, por lo que el sistema alcanza el estado de equilibrio en el que el potencial de membrana contrarresta al gradiente de concentración del $K^+$.

Cuantitativamente, la relación entre la concentración iónica y el potencial de membrana viene dada por la **ecuación de Nernst**:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

donde *V* es el potencial de equilibrio en voltios, *R* es la constante de los gases, *T* es la temperatura absoluta, *z* es la carga del ión, *F* es la constante de Faraday, y $C_o$ y $C_i$ son las concentraciones del ión en el exterior y en el interior celular, respectivamente. Existe un potencial de equilibrio para cada ión por separado, y el potencial de membrana viene determinado por el flujo de todos los iones que atraviesan la membrana plasmática. Sin embargo, debido a que los axones de calamar en reposo son más permeables al $K^+$ que al $Na^+$ o que a otros iones (incluyendo $Cl^-$), el potencial en reposo de membrana (–60 mV) se encuentra próximo al potencial de equilibrio determinado por las concentraciones intracelulares y extracelulares de $K^+$ (–75 mV).

A medida que los impulsos nerviosos (**potenciales de acción**) viajan a lo largo de los axones, la membrana se despolariza (Fig. 12.21). El potencial de

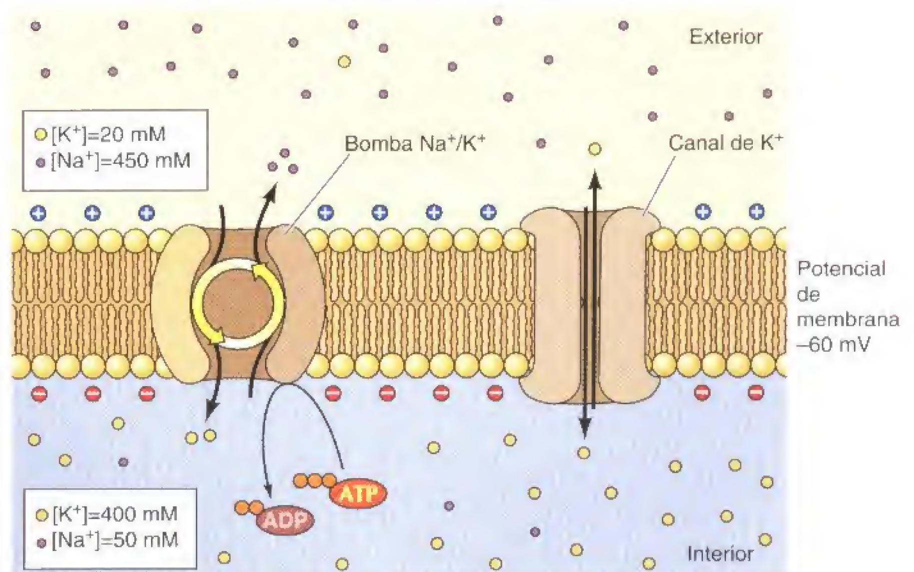



*Figura 12.20*
**Gradientes iónicos y potencial de membrana en reposo del axón de calamar gigante.** Solamente se representan las concentraciones de $Na^+$ y $K^+$ debido a que éstos son los iones que actúan en la transmisión del impulso nervioso. El $Na^+$ es bombeado fuera de la célula, mientras que el $K^+$ es bombeado hacia el interior, por lo que la concentración de $Na^+$ es superior en el exterior que en el interior del axón, y la concentración de $K^+$ es mayor dentro que fuera. La membrana en reposo es más permeable al $K^+$ que al $Na^+$ u otros iones porque contiene canales de $K^+$ abiertos. El flujo de $K^+$ a través de estos canales supone una mayor aportación al potencial de membrana en reposo de –60 mV, que estará próximo al potencial de equilibrio del $K^+$.

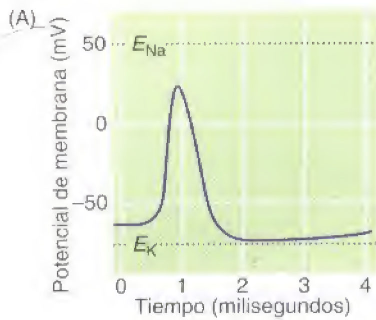



*Figura 12.21*

**Potencial de membrana y canales iónicos durante un potencial de acción.** (A) Variación del potencial de membrana en un punto del axón gigante de calamar después de un estímulo. $E_{Na}$ y $E_K$ son los potenciales de equilibrio para el $Na^+$ y el $K^+$, respectivamente. (B) Primero, el potencial de membrana aumenta a medida que se abren los canales de $Na^+$ regulados por voltaje. Después, el potencial de membrana cae por debajo de su valor de reposo a medida que los canales de $Na^+$ se inactivan y los canales de $K^+$ regulados por voltaje se abren. Entonces los canales de $K^+$ regulados por voltaje se inactivan, y el potencial de membrana retorna a su valor de reposo.

membrana varía desde −60 mV a, aproximadamente, +30 mV en menos de un milisegundo, tras lo cual vuelve a ser negativo y retorna a su valor de reposo. Estos cambios se deben a la apertura y cierre rápido y secuencial de los canales de $Na^+$ y $K^+$ regulados por voltaje. Una variación pequeña del potencial de membrana (de −60 mV a −40 mV) provoca la rápida apertura de los canales de $Na^+$. Esto permite el flujo de $Na^+$ al interior celular, motivado tanto por su gradiente de concentración como por el potencial de membrana. La repentina entrada de $Na^+$ causa una gran alteración en el potencial de membrana, que aumenta a cerca de +30 mV, acercándose al potencial de equilibrio del $Na^+$ que es aproximadamente +50 mV. En ese momento se inactivan los canales de $Na^+$ y se abren los canales de $K^+$ regulados por voltaje, aumentando sensiblemente la permeabilidad de la membrana al $K^+$. El $K^+$ entonces sale rápidamente de la célula, debido tanto al potencial de membrana como al gradiente de concentración del $K^+$, lo que provoca que el potencial de membrana descienda rápidamente hasta valo-

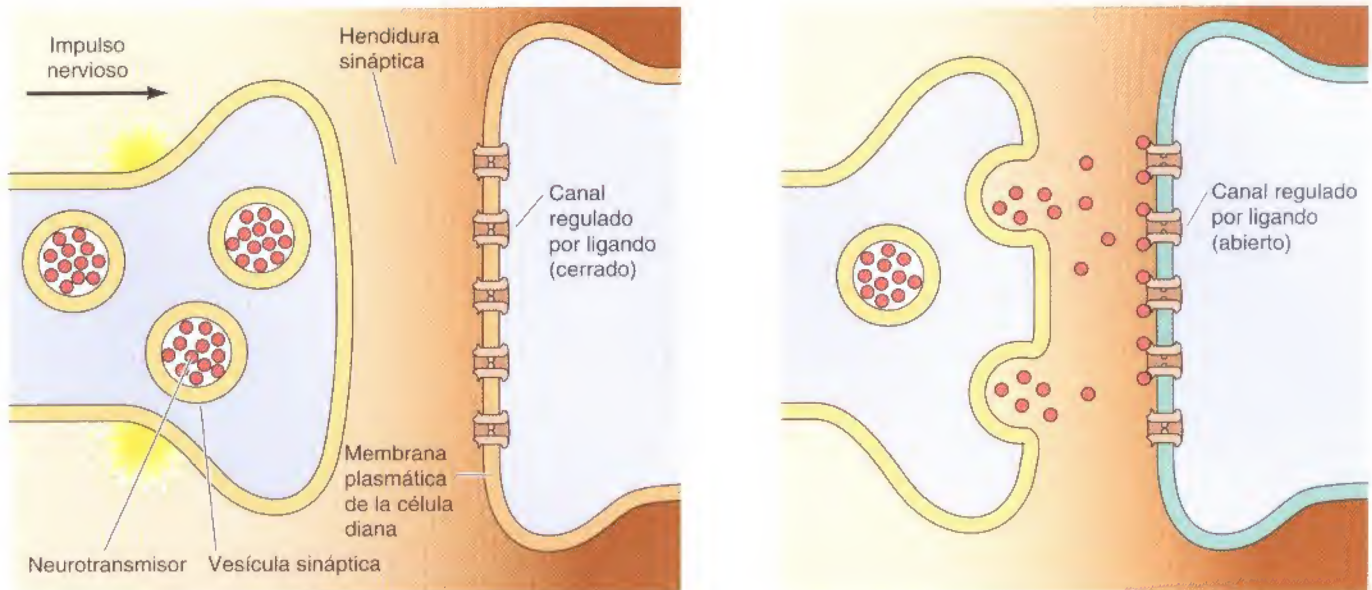



*Figura 12.22*
**Señalización por la liberación de neurotransmisores en una sinapsis.** La llegada de un impulso nervioso al terminal de una neurona es una señal que induce la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, lo que da lugar a la liberación del neurotransmisor desde la célula presináptica a la hendidura sináptica. El neurotransmisor se une a los receptores y abre los canales iónicos regulados por ligando en la membrana plasmática de la célula diana.

res de –75 mV (el potencial de equilibrio del $K^+$). Entonces se inactivan los canales de $K^+$ regulados por voltaje y el potencial de membrana retorna a su nivel de reposo de –60 mV, determinado por el flujo de $K^+$ y de otros iones a través de los canales que permanecen abiertos en las células no estimuladas.

La despolarización de las regiones adyacentes de la membrana plasmática permite a los potenciales de acción viajar a lo largo de los axones de las células nerviosas como señales eléctricas, dando como resultado la rápida transmisión de los impulsos nerviosos a través de largas distancias. Por ejemplo, los axones de las motoneuronas humanas pueden medir más de un metro de longitud. La llegada de los potenciales de acción a los terminales de la mayoría de las neuronas señala la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, que portan las señales entre las células en la sinapsis (Fig. 12.22). Los neurotransmisores liberados desde las células presinápticas se unen a receptores en la membrana de las células postsinápticas, donde inducen la apertura de los canales iónicos regulados por voltaje. Uno de los canales mejor conocidos es el receptor de la acetilcolina de las células musculares. La unión de la acetilcolina abre un canal que es permeable tanto al $Na^+$ como al $K^+$. Esto permite la entrada rápida del $Na^+$ que despolariza la membrana de la célula muscular y dispara un potencial de acción. El potencial de acción causa la apertura de los canales de $Ca^{2+}$ regulados por voltaje lo que produce un aumento del $Ca^{2+}$ intracelular, que será la señal para la contracción (véase Fig. 11.25).

El receptor de la acetilcolina, aislado inicialmente a partir del órgano eléctrico de la raya *Torpedo* en los años 70, es el prototipo de los canales regulados por ligando. El receptor está constituido por cinco subunidades dispuestas en la membrana a modo de un cilindro (Fig. 12.23). Se cree que en su estado cerrado, el poro del canal se encuentra bloqueado por las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos. La unión de la acetilcolina induce un cambio confor-

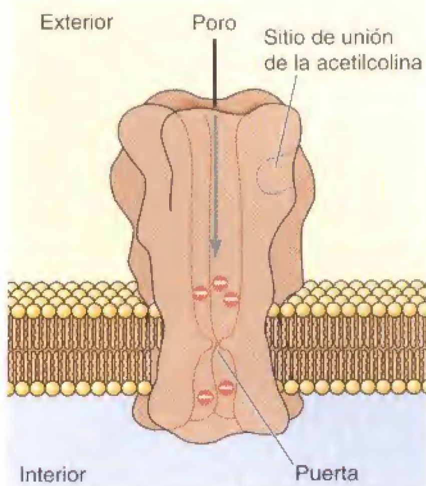



*Figura 12.23*
**Modelo del receptor de acetilcolina.** El receptor está constituido por cinco subunidades dispuestas alrededor de un poro central. La unión de la acetilcolina a un sitio de la región extracelular del receptor induce cambios alostéricos que abren la puerta del canal. El canal está recubierto por aminoácidos cargados negativamente que impiden el flujo de los iones negativos. (Adaptado de N. Unwin, 1993. Cell 72/*Neuron* 10 (Suppl.): 31.)

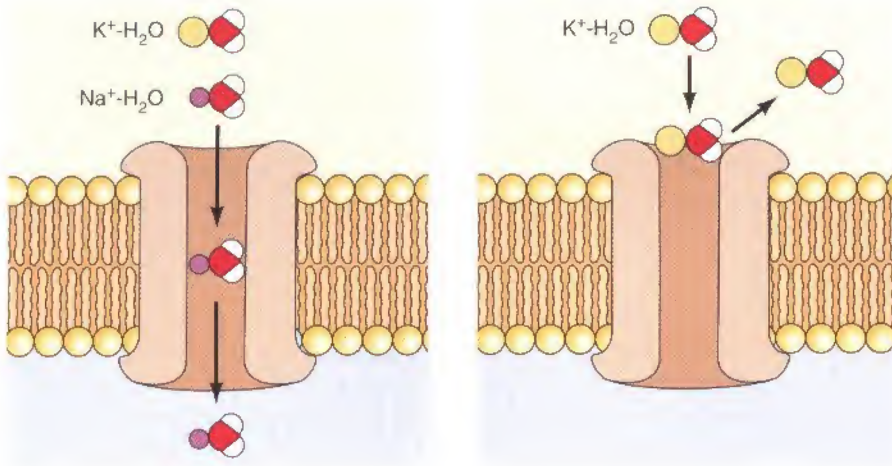


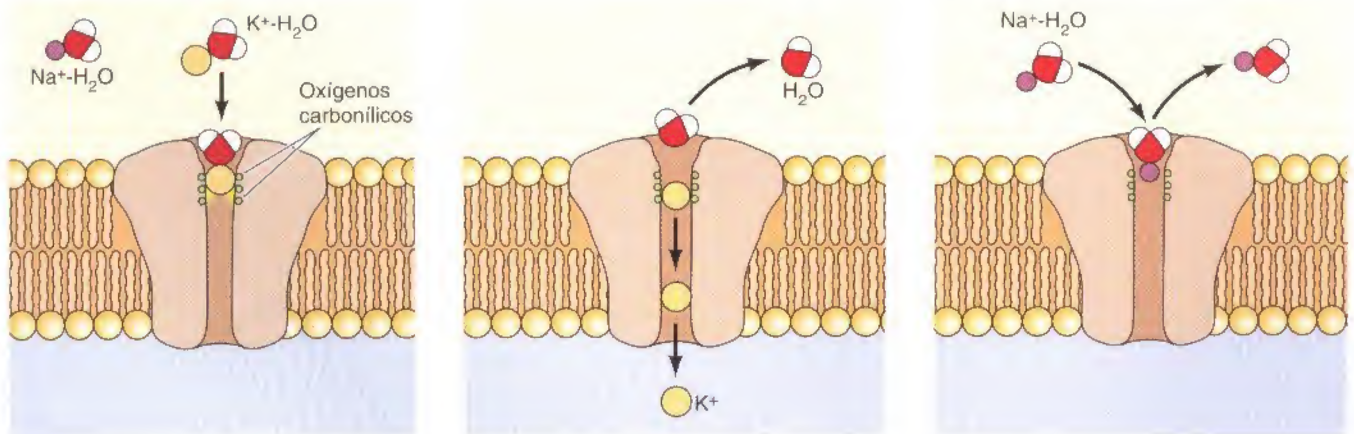

*Figura 12.24*
**Selectividad iónica de los canales de $Na^+$.** Un poro estrecho permite el paso del $Na^+$ unido a una única molécula de agua, pero impide el paso del $K^+$ o de iones mayores.

macional en el receptor de forma que estas cadenas laterales hidrofóbicas dejan de estar en el canal, abriendo un poro que permite el paso de los iones con carga positiva, incluyendo $Na^+$ y $K^+$. Sin embargo, el canal permanece impermeable a los iones con carga negativa, como el $Cl^-$, debido a que está recubierto por aminoácidos cargados negativamente.

Los canales de $Na^+$ y $K^+$ regulados por voltaje presentan un mayor grado de selectividad iónica. Los canales de $Na^+$ son más de 10 veces más permeables al $Na^+$ que al $K^+$, mientras que los canales de $K^+$ son más de mil veces más permeables al $K^+$ que al $Na^+$. La selectividad del canal de $Na^+$ se puede explicar, al menos en parte, mediante la presencia de un poro estrecho que actúa como un filtro de tamaño. El radio iónico del $Na^+$ (0,95 Å) es más pequeño que el del $K^+$ (1,33 Å), y se cree que el poro del canal de $Na^+$ es lo suficientemente estrecho como para impedir el paso del $K^+$ o de iones más grandes (Fig. 12.24).

Los canales de $K^+$ también tienen poros estrechos, que impiden el paso de los iones mayores. Sin embargo, ya que el $Na^+$ tiene un radio iónico más pequeño, esto no explica la permeabilidad selectiva de estos canales hacia el $K^+$. La selectividad del canal de $K^+$ se basa en un mecanismo diferente, que fue elucidado al determinarse la estructura tridimensional de un canal de $K^+$ por cristalografía de rayos X en 1998 (Fig. 12.25). El poro del canal contiene un filtro selectivo estrecho que está delimitado por oxígenos carbonílicos (C═O) del esqueleto polipeptídico. Cuando un ion $K^+$ entra en el filtro de selección interacciona con estos oxígenos carbonílicos, y las moléculas de agua a las que estaba unido el $K^+$ se desplazan, lo que permite al $K^+$ deshidratado pasar a través

*Figura 12.25*
**Selectividad de los canales de $K^+$.** El canal de $K^+$ contiene un filtro selectivo estrecho, delimitado por átomos de oxígeno carbonílico (C═O). El poro es lo suficientemente ancho como para permitir el paso de $K^+$ deshidratado, del cual han sido desplazadas todas las moléculas de agua asociadas debido a las interacciones entre el $K^+$ y estos grupos cetónicos. El $Na^+$ es demasiado pequeño para interaccionar con los grupos cetónicos del filtro selectivo, por lo que permanece unido al agua en un complejo que es demasiado grande para pasar a través del poro del canal.



del poro. Sin embargo, un $Na^+$ deshidratado es demasiado pequeño para interaccionar con estos oxígenos carbonílicos en el filtro selectivo, el cual se mantiene abierto. Como consecuencia, el $Na^+$ permanece unido a las moléculas de agua en un complejo hidratado que es demasiado grande para pasar a través del canal.

Los canales de $Na^+$, $K^+$, y $Ca^{2+}$ regulados por voltaje pertenecen todos a una gran familia de proteínas relacionadas (Fig. 12.26). Por ejemplo, la secuencia genómica de *C. elegans* ha revelado cerca de 200 genes que codifican canales iónicos, que presumiblemente desempeñan diversos papeles en la señalización celular. Los canales de $K^+$ están constituidos por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene o dos o seis $\alpha$-hélices transmembrana. Los canales de $Na^+$ y $Ca^{2+}$ están constituidos por una única cadena polipeptídica, pero cada polipéptido contiene cuatro dominios repetidos que corresponden a las subunidades del canal de $K^+$. La regulación de la apertura por voltaje se debe a una de las $\alpha$-hélices transmembrana, que contiene múltiples aminoácidos cargados positivamente. La despolarización de la membrana induce el movimiento de estas cargas positivas hacia el exterior celular, lo que altera la posición de este seg-

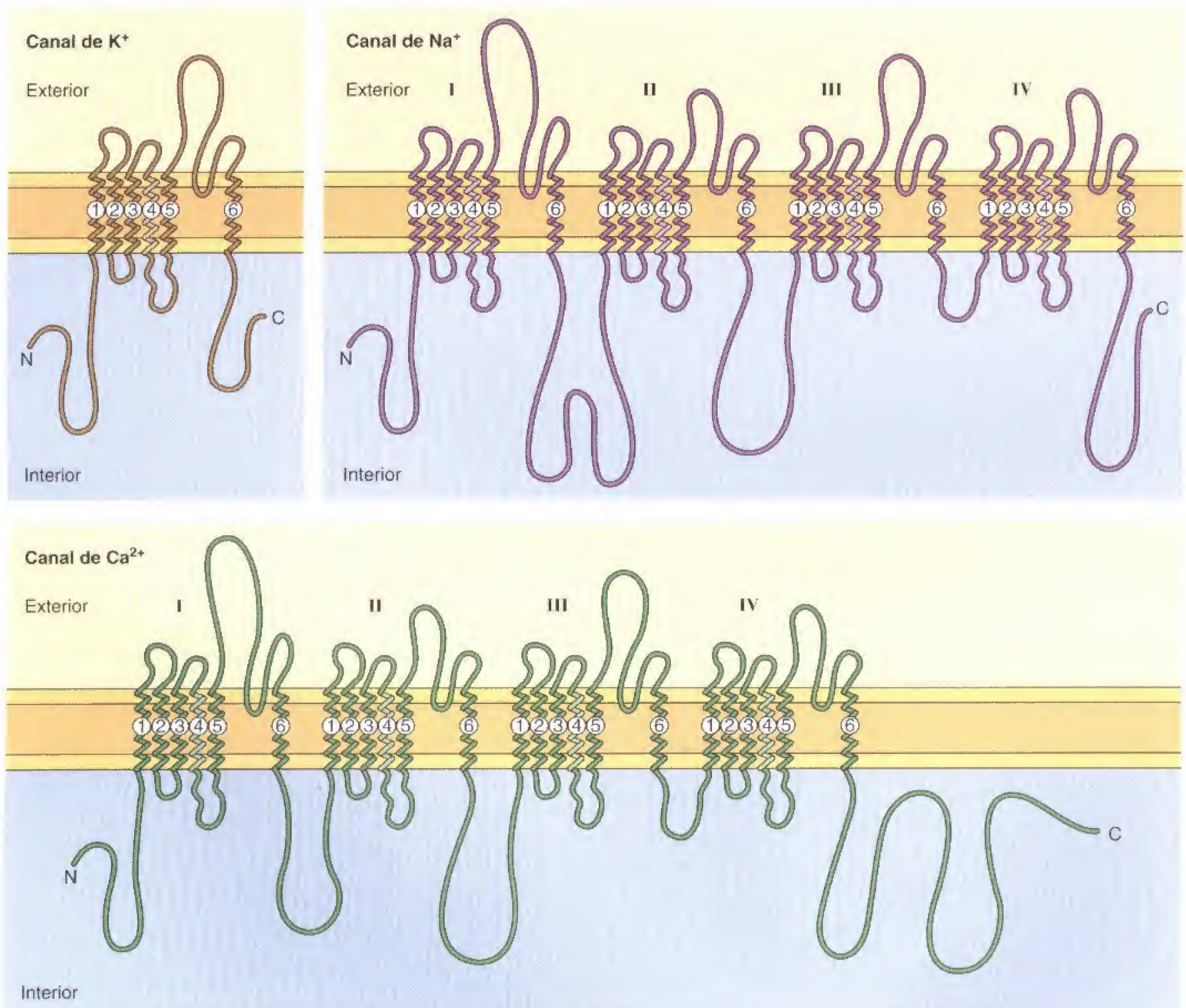



*Figura 12.26*

**Estructuras de los canales catiónicos regulados por voltaje.** Los canales de $K^+$, $Na^+$, y $Ca^{2+}$ pertenecen a una familia de proteínas relacionadas. El canal de $K^+$ está formado por la asociación de cuatro subunidades idénticas, una de las cuales se muestra en la figura. El canal de $Na^+$ está constituido por una única cadena polipeptídica que contiene cuatro dominios repetidos, cada uno de los cuales es similar a una subunidad del canal de $K^+$. El canal de $Ca^{2+}$ es similar al canal de $Na^+$. Cada subunidad o dominio contiene seis $\alpha$-hélices que atraviesan la membrana. La $\alpha$-hélice designada como 4 contiene varios aminoácidos cargados positivamente y actúa como el sensor de voltaje que interviene en la apertura del canal en respuesta a las variaciones en el potencial de membrana.

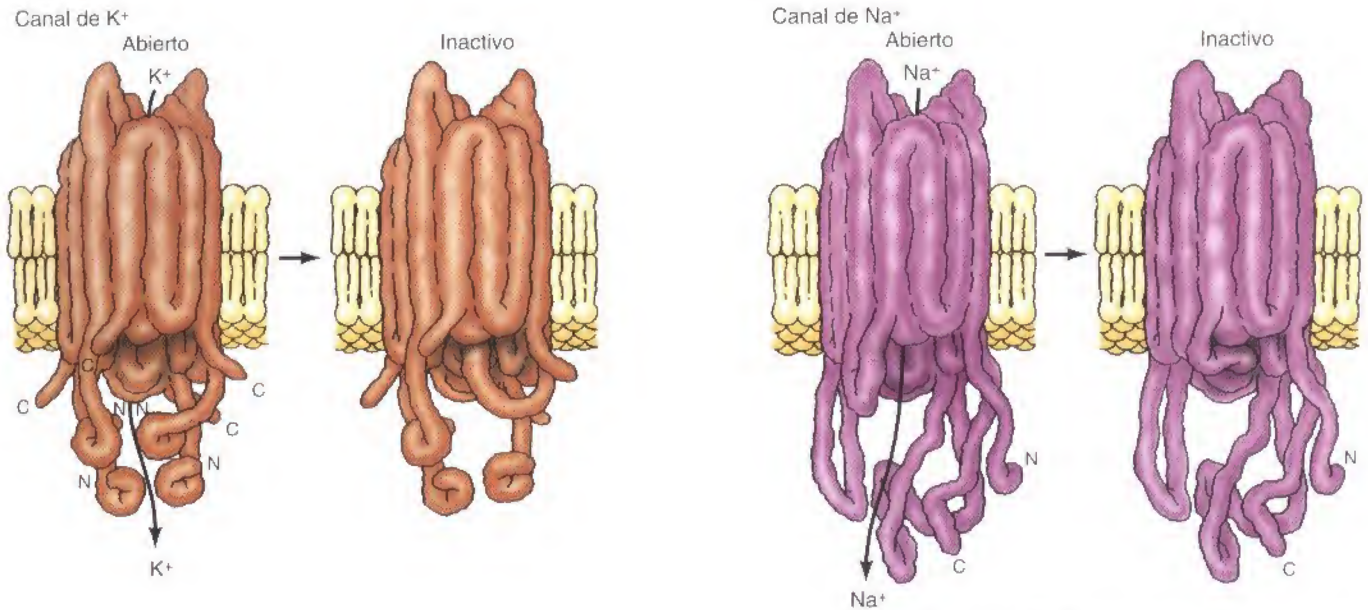



*Figura 12.27*
**Inactivación de los canales de $K^+$ y de $Na^+$.** Tras la apertura regulada por voltaje, los canales de $K^+$ y de $Na^+$ se inactivan rápidamente por la unión al poro de las fracciones citoplasmáticas de las cadenas polipeptídicas. En el caso del canal de $K^+$, la inactivación se realiza mediante un mecanismo de bola-y-cadena en el que la bola corresponde al extremo amino terminal de la cadena polipeptídica. En el caso del canal de $Na^+$, la inactivación viene mediada por el bucle intracelular que conecta los dominios III y IV.

mento transmembrana y se abre el canal. La rápida inactivación de los canales de $Na^+$ y $K^+$ durante la propagación de los potenciales de acción es debida a las porciones citoplasmáticas de la cadena polipeptídica, que se unen a la boca citoplasmática del poro del canal e impiden el flujo iónico (Fig. 12.27).

Una amplia variedad de canales iónicos (incluyendo los canales de $Ca^{2+}$ y $Cl^-$) responden a diferentes neurotransmisores, o se abren y cierran con una cinética diferente tras la despolarización de la membrana. Las acciones concertadas de todos estos canales son las responsables de la complejidad de la señalización en el sistema nervioso. Más aún, tal y como se describe en el próximo capítulo, el papel de los canales iónicos no se limita a las células eléctricamente excitables del nervio y del músculo; también desempeñan un papel crítico en la señalización en otros tipos de células. Por lo tanto, la apertura y el cierre regulados de los canales iónicos proporciona a las células un mecanismo sensible y versátil para responder a diversos estímulos ambientales.

## *Transporte activo dirigido por la hidrólisis de ATP*

El flujo neto de las moléculas por difusión facilitada, tanto a través de proteínas transportadoras como de proteínas de canal, siempre es energéticamente favorable en la dirección que determine el gradiente electroquímico a través de la membrana. Sin embargo, en muchos casos, la célula debe transportar moléculas en contra de su gradiente de concentración. En el **transporte activo**, se utiliza la energía proporcionada por otra reacción acoplada (como la hidrólisis de ATP) para dirigir el transporte de las moléculas en la dirección energéticamente desfavorable.

Las **bombas iónicas**, que son las responsables de mantener el gradiente iónico a través de la membrana plasmática, son un buen ejemplo de transporte activo dirigido directamente por la hidrólisis de ATP. Como ya se mencionó anteriormente (véase Tabla 12.1), la concentración de $Na^+$ es aproximadamente diez veces superior fuera que dentro de las células, mientras que la concentración de $K^+$ es mayor dentro que fuera. Estos gradientes iónicos se mantienen por la **bomba de $Na^+$ – $K^+$** (también llamada la **ATPasa $Na^+$ – $K^+$**), que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar $Na^+$ y $K^+$ contra sus gradientes electroquímicos. Este proceso es el resultado de una serie de cambios conformacionales de la bomba, dirigidos por el ATP (Fig. 12.29). En primer

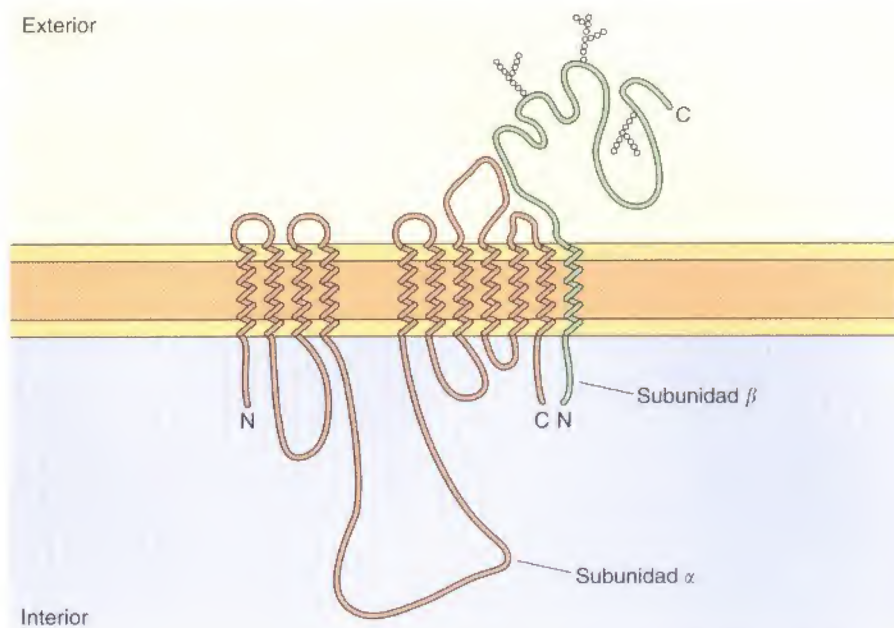



*Figura 12.28*
**Estructura de la bomba $Na^+$-$K^+$.** La bomba de $Na^+$-$K^+$ es un heterodímero con una subunidad α con 10 dominios transmembrana y una subunidad β con un solo dominio transmembrana. La subunidad β está altamente glicosilada.

lugar, los iones $Na^+$ se unen a sitios de alta afinidad dentro de la célula. Esta unión estimula la hidrólisis de ATP y la fosforilación de la bomba, lo que induce un cambio conformacional que expone los sitios de unión de $Na^+$ al exterior de la célula y reduce su afinidad por el $Na^+$. Como consecuencia, el $Na^+$ fijado se libera en los fluidos extracelulares. Al mismo tiempo, los sitios de unión de $K^+$ de alta afinidad se exponen sobre la superficie celular. La unión de $K^+$ extracelular a estos sitios estimula entonces la hidrólisis del grupo fosfato unido a la bomba, lo que induce un segundo cambio conformacional, exponiendo los sitios de unión de $K^+$ al citosol y disminuyendo su afinidad, por lo que el $K^+$ es liberado al interior de la célula. La bomba tiene tres sitios de unión para el $Na^+$ y dos para el $K^+$ , por lo que en cada ciclo se tansportan tres $Na^+$ y dos $K^+$ a través de la membrana plasmática a costa de una molécula de ATP.

La importancia de la bomba de $Na^+$–$K^+$ queda reflejada en el hecho de que se estima que consume casi el 25 % del ATP utilizado por muchas células animales. Un papel crítico de los gradientes de $Na^+$ y $K^+$ establecidos por la bomba es la propagación de las señales eléctricas en el nervio y en el músculo. Como se describe a continuación, el gradiente de $Na^+$ establecido por la bomba también se emplea para dirigir el transporte activo de otras moléculas. Otro papel importante de la bomba $Na^+$ – $K^+$ en la mayoría de las células animales es mantener el equilibrio osmótico y el volumen celular. El citoplasma contiene una alta concentración de moléculas orgánicas, incluyendo macromoléculas, aminoácidos, azúcares, y nucleótidos. En ausencia de algo que lo compense, esto provocaría un flujo de agua hacia el interior por ósmosis, que si no fuera controlado provocaría que la célula se hinchara y, en última instancia, explotara. La compensación requerida la proporciona el gradiente iónico establecido por la bomba de $Na^+$ – $K^+$ (Fig. 12.30). Concretamente, la bomba establece una mayor concentración de $Na^+$ en el exterior que en el interior de la célula. Además, como ya se ha descrito, el flujo de $K^+$ a través de los canales abiertos genera un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. Este potencial de membrana, a su vez, dirige al $Cl^-$ fuera de la célula, por lo que la concentración de $Cl^-$ (como la del $Na^+$) es casi diez veces mayor en el fluido extracelular que en el citoplasma. Estas diferencias en la concentración iónica equilibran la elevada concentración de las moléculas orgánicas dentro de las células, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

Exterior

Interior

3 $Na^+$

3 $Na^+$ se unen a sitios expuestos dentro de la célula.

ATP

ADP

La unión del $Na^+$ estimula la fosforilación ATP-dependiente de la bomba.

3 $Na^+$

Tras la fosforilación, los sitios de unión del $Na^+$ quedan expuestos a la superficie celular y disminuye su afinidad, por lo que el $Na^+$ se libera al exterior de la célula.

2 $K^+$

Al mismo tiempo, 2 $K^+$ se unen a sitios de alta afinidad expuestos a la superficie celular.

La unión del $K^+$ estimula la desfosforilación de la bomba.

2 $K^+$

La bomba entonces recupera su conformación original liberando $K^+$ al interior de la célula.

*Figura 12.29*
**Modelo de funcionamiento de la bomba $Na^+ - K^+$.**

El transporte activo de $Ca^{2+}$ a través de la membrana plasmática es dirigido por una bomba de $Ca^{2+}$ que está relacionada estructuralmente con la bomba de $Na^+ - K^+$, y que también es impulsada por la hidrólisis de ATP. La bomba de $Ca^{2+}$ transporta $Ca^{2+}$ fuera de la célula, por lo que las concentraciones intracelulares de $Ca^{2+}$ son extremadamente bajas: aproximadamente 0,1 $\mu M$ respecto a la concentración extracelular de casi 1 m*M*. Esta concentración intracelular de $Ca^{2+}$ tan baja hace que la célula sea sensible a pequeños incrementos en el nivel de $Ca^{2+}$ intracelular. Este incremento transitorio del $Ca^{2+}$ intracelular desempeña un papel importante en la señalización celular, como ya se mencionó al hablar de la contracción muscular (véase Fig. 11.25) y como se tratará con más detalle en el siguiente capítulo.

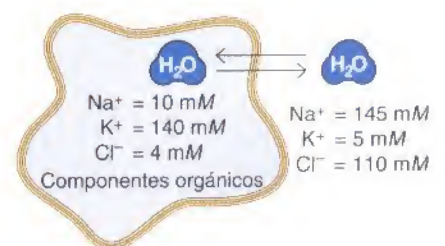



*Figura 12.30*
**Gradientes iónicos a través de la membrana plasmática de una célula típica de mamífero.** Las concentraciones de $Na^+$ y $Cl^-$ son mayores fuera que dentro de la célula, mientras que la concentración de $K^+$ es mayor dentro que fuera. Las bajas concentraciones de $Na^+$ y $Cl^-$ equilibran la alta concentración intracelular de los componentes orgánicos, igualando la presión osmótica y previniendo el flujo neto de agua hacia el interior.

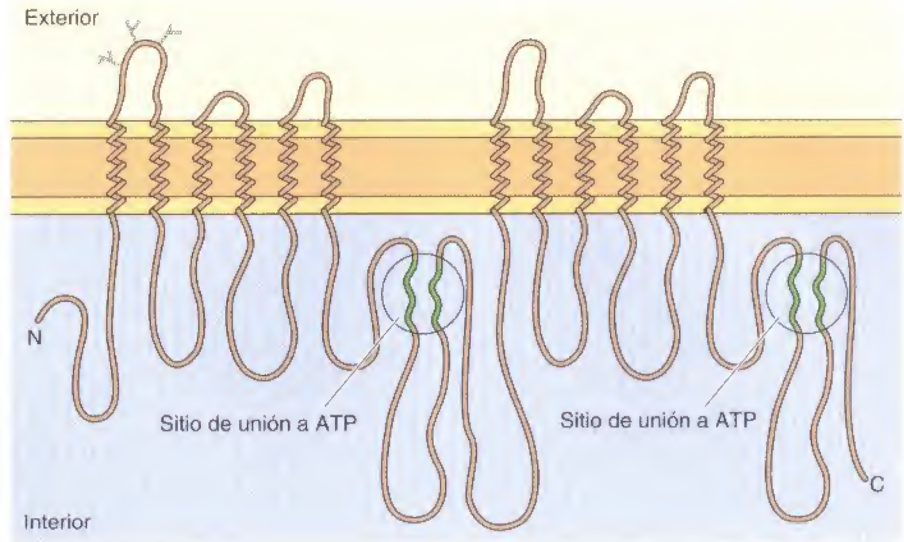



*Figura 12.31*
**Estructura de un transportador ABC.** La unidad básica estructural de un transportador ABC está constituida por seis dominios transmembrana seguidos de una caja de unión de ATP. En los transportadores de la membrana plasmática (como el transportador MDR que aquí se muestra), dos de estas unidades se fusionan, por lo que el transportador está constituido por 12 dominios transmembrana y dos sitios de unión a ATP.

En las membranas plasmáticas de bacterias, levaduras, y células vegetales, las responsables del transporte activo de $H^+$ fuera de la célula son unas bombas iónicas similares. Además, el $H^+$ es bombeado de forma activa hacia fuera en las células que recubren el estómago, produciendo la acidez de los fluidos gástricos. Las responsables del transporte activo de $H^+$ al interior de los lisosomas y de los endosomas son bombas estructuralmente distintas (véase Fig. 9.35). Todavía un tercer tipo de bomba de $H^+$ es la ATP sintetasa de mitocondrias y cloroplastos. En este caso se puede considerar que la bomba opera en el sentido contrario, utilizando el movimiento de los iones en contra del gradiente electroquímico para dirigir la síntesis de ATP.

La mayor familia de transportadores de membrana está constituida por los **transportadores ABC**, llamados así porque se caracterizan por unos dominios de unión a ATP altamente conservados, o cajas de unión a ATP (***A**TP-**b**inding **c**assettes*) (Fig. 12.30). Se han identificado más de cien miembros de esta familia en células tanto procariotas como eucariotas. En bacterias, los transportadores ABC utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar una gran variedad de moléculas, incluyendo iones, azúcares, y aminoácidos. En células eucariotas, el primer transportador ABC se descubrió como el producto de un gen (llamado gen de resistencia a múltiples drogas, o *mdr*) que hace resistentes a las células cancerosas a varios fármacos empleados en quimioterapia. Se han identificado dos transportadores MDR. Se expresan normalmente en varios tipos de células, donde intervienen eliminando compuestos extraños potencialmente tóxicos. Por ejemplo, la expresión de un transportador MDR en las células endoteliales de los capilares cerebrales parece que desempeña un papel importante en la protección del cerebro frente a sustancias químicas tóxicas. Desafortunadamente, se suele alcanzar con frecuencia un alto nivel de expresión de los transportadores MDR en las células cancerosas, donde reconocen a diversos fármacos y los bombean hacia el exterior de las células. Esto hace a las células cancerosas resistentes a un amplio espectro de agentes quimioterapeúticos y supone un obstáculo importante para un tratamiento eficaz del cáncer.

Otro miembro importante, clínicamente hablando, de la familia de transportadores ABC es el gen responsable de la fibrosis quística. El producto de este gen (llamado regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística, o CFTR, —del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), aunque es un miembro de la familia ABC, actúa como un canal de $Cl^-$ en las células epiteliales, y la característica de esta enfermedad es un transporte de-

fectuoso del $Cl^-$. El canal de $Cl^-$ CFTR también es peculiar puesto que parece requerir tanto la hidrólisis de ATP como una fosforilación dependiente de AMPc para poder abrirse. La base estructural del funcionamiento del CFTR como un canal iónico regulado deberá ser elucidada en investigaciones futuras.

### *Transporte activo dirigido por gradientes iónicos*

Las bombas iónicas y los transportadores ABC descritos en la sección anterior utilizan la energía derivada directamente de la hidrólisis de ATP para transportar moléculas contra sus gradientes electroquímicos. Otras moléculas se transportan en contra de su gradiente de concentración empleando energía derivada no de la hidrólisis de ATP sino de acoplar el transporte de una segunda molécula en la dirección favorable energéticamente. El gradiente de $Na^+$ que establece la bomba de $Na^+ - K^+$ proporciona una fuente de energía que se emplea con frecuencia para alimentar el transporte activo de azúcares, aminoácidos, e iones en las células de mamíferos. Los gradientes de $H^+$ establecidos por las bombas de $H^+$ de bacterias, levaduras, y células vegetales desempeñan un papel similar.

Las células epiteliales que revisten el intestino proporcionan un buen ejemplo de transporte activo dirigido por el gradiente de $Na^+$. Estas células emplean sistemas de transporte activo en los dominios apicales de sus membranas plasmáticas para tomar los azúcares y aminoácidos de la dieta desde la luz del intestino. La toma de glucosa, por ejemplo, se lleva a cabo por un transportador que transporta coordinadamente dos iones $Na^+$ y una glucosa hacia dentro de la célula (Fig. 12.32). El flujo de $Na^+$ a favor de su gradiente electroquímico proporciona la energía requerida para tomar la glucosa de la dieta y acumular altas concentraciones intracelulares de glucosa. Entonces la glucosa se libera en el tejido conectivo subyacente (que contiene capilares sanguíneos) por la superficie basolateral del epitelio intestinal, a favor de su gradiente de concentración, mediante transporte por difusión facilitada (Fig. 12.33). De esta forma, la toma de glucosa desde la luz intestinal y su liberación a la circulación proporciona un buen ejemplo de la función polarizada de las células epiteliales, que se debe a la localización específica de los transportadores de transporte activo y de difusión facilitada en los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, respectivamente.

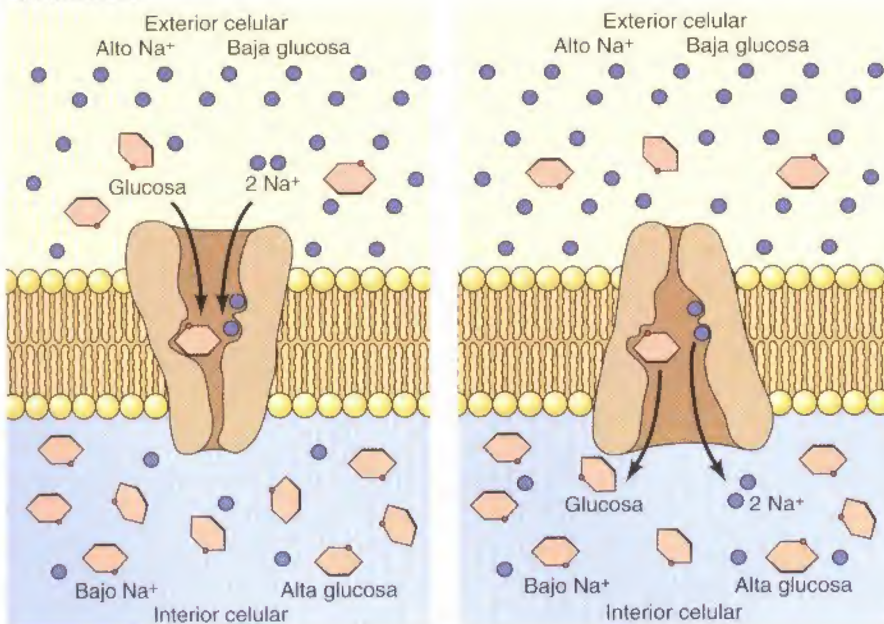
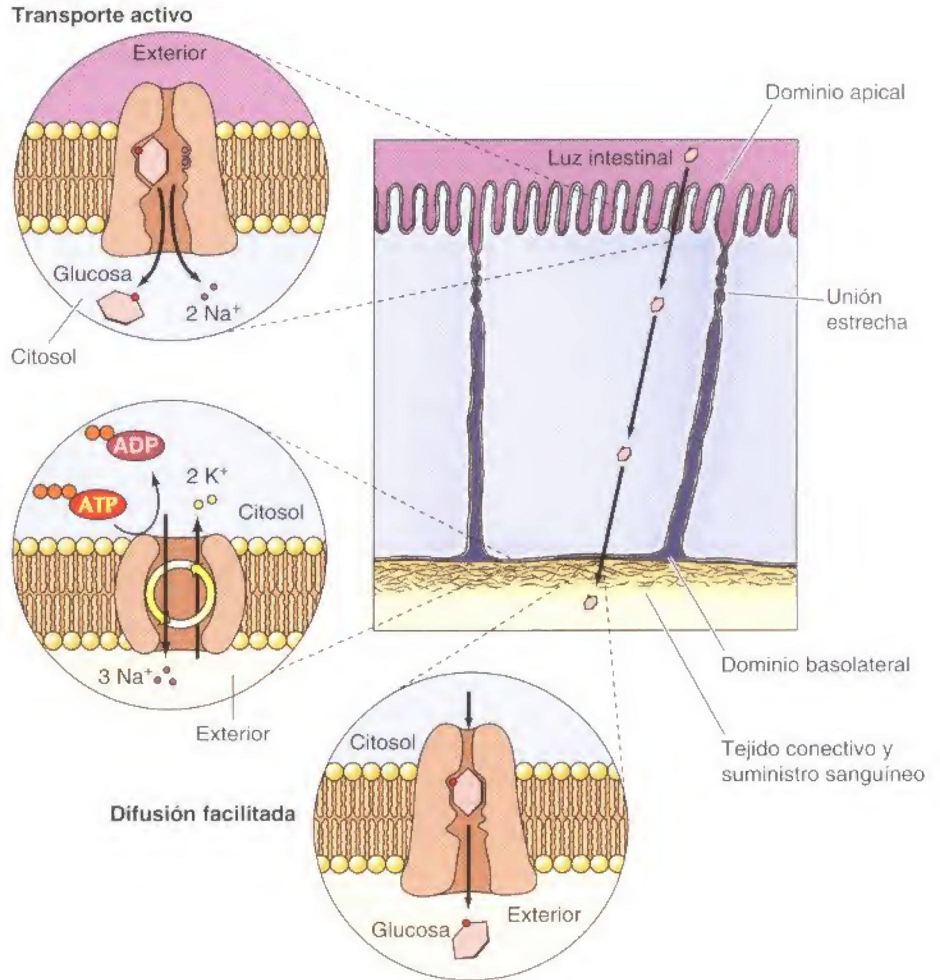



*Figura 12.32*
**Transporte activo de la glucosa.** El transporte activo dirigido por el gradiente de $Na^+$ es el responsable de la entrada de glucosa desde la luz intestinal. El transportador, de forma coordinada, une y transporta una glucosa y dos $Na^+$ al interior de la célula. El transporte de $Na^+$ en la dirección energéticamente favorable es el que dirige la entrada de la glucosa contra su gradiente de concentración.

*Figura 12.33*
**Transporte de glucosa por las células epiteliales intestinales.** Un transportador en el dominio apical de la membrana plasmática es el responsable de la entrada activa de glucosa (por cotransporte con $Na^+$) desde la luz intestinal. Como resultado, la glucosa de la dieta es absorbida y concentrada dentro de las células epiteliales intestinales. La glucosa entonces se transfiere desde estas células al tejido conectivo circundante y a la corriente sanguínea a través de difusión facilitada, mediada por un transportador en el dominio basolateral de la membrana plasmática. El sistema es dirigido por la bomba de $Na^+ - K^+$, que también se encuentra en el dominio basolateral. Reseñar que la entrada de glucosa desde el tracto digestivo y su transferencia a la circulación depende de que los transportadores de glucosa de transporte activo y de difusión facilitada se localicen de manera restringida en los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, respectivamente.




La entrada coordinada de glucosa y $Na^+$ es un ejemplo de **simporte**, el transporte de dos moléculas en la misma dirección. Por el contrario, la difusión facilitada de glucosa es un ejemplo de **uniporte**, el transporte de una única molécula. El transporte activo también puede tener lugar por **antiporte**, en el que dos moléculas se transportan en direcciones opuestas (Fig. 12.33). Por ejemplo, el $Ca^{2+}$ se exporta desde las células no sólo por la bomba de $Ca^{2+}$ sino también por un antiporte de $Na^+ - Ca^{2+}$ que transporta $Na^+$ hacia dentro de la célula y $Ca^{2+}$ hacia fuera. Otro ejemplo viene dado por la proteína de intercambio de $Na^+ - H^+$, que actúa en la regulación del pH intracelular. El antiportador de $Na^+ - H^+$ acopla el transporte de $Na^+$ hacia dentro de la célula con la exportación de $H^+$, y de esta forma elimina el exceso de $H^+$ producido por las reacciones metabólicas y previene la acidificación del citoplasma.

## Endocitosis

Las proteínas transportadoras y de canal descritas en la sección anterior transportan moléculas pequeñas a través de la bicapa fosfolipídica. Las células eucariotas también son capaces de captar macromoléculas y partículas del me-

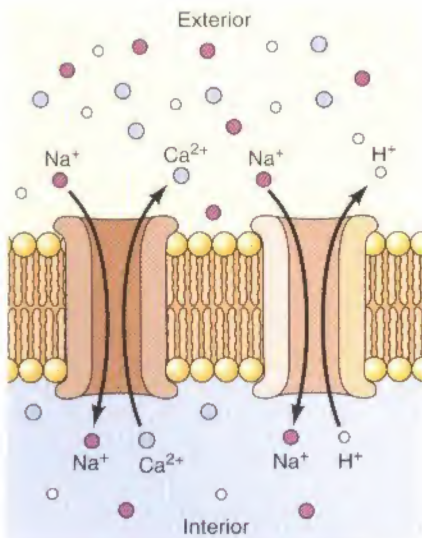



*Figura 12.34*
**Ejemplos de antiporte.** El $Ca^{2+}$ y los $H^+$ se exportan de las células por antiportadores, que acoplan su exportación a un importe energéticamente favorable de $Na^+$.



## Medicina molecular

# *Fibrosis quística*

### La enfermedad

La fibrosis quística es una enfermedad genética recesiva que afecta a niños y a adultos jóvenes. Es la enfermedad hereditaria letal más común de los Caucásicos, resultando afectados aproximadamente uno de cada 2.500 nacidos vivos, aunque es poco frecuente en otras razas. La disfunción característica en la fibrosis quística es la producción de un *mucus* anormalmente espeso y pegajoso por parte de varios tipos de células epiteliales, incluyendo las células que revisten los tractos respiratorio y gastrointestinal. La manifestación clínica principal es una enfermedad respiratoria debida a que las vías aéreas pulmonares se obstruyen con espesos tapones de moco, seguida del desarrollo de infecciones bacterianas recurrentes. En la mayoría de los pacientes, también afecta al páncreas debido a que los conductos pancreáticos están obstruidos por el *mucus*. Las glándulas sudoríparas también funcionan anormalmente, y la presencia de un exceso de sal en el sudor es un carácter diagnóstico de la fibrosis quística.

El tratamiento actual de la enfermedad incluye la terapia física para promover el drenaje bronquial, la administración de antibióticos, y la reposición de las enzimas pancreáticas. Aunque este tratamiento ha prolongado la supervivencia de los individuos afectados hasta cerca de los 30 años de edad, la fibrosis quística es finalmente mortal, siendo la enfermedad pulmonar la responsable del 95 % de la mortalidad.

### Bases moleculares y celulares

La característica particular de la fibrosis quística es un transporte defectuoso de $Cl^-$ en el epitelio afectado, incluyendo los conductos sudoríparos y las células que revisten el tracto respiratorio. En 1984 se demostró que los canales de $Cl^-$ no funcionaban normalmente en las células epiteliales de los pacientes de fibrosis quística. La base molecular de la enfermedad se aclaró en 1989 al aislarse el gen de la fibrosis quística como un clon molecular. La secuencia del gen reveló que codificaba una proteína (denominada CFTR de **c***ystic* **f***ibrosis* **t***ransmembrane* **c***onductance* **r***egulator*, regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística) que pertenecía a la familia de los transportadores ABC. Varios estudios posteriores demostraron que el CFTR actúa como un canal de $Cl^-$ y que las mutaciones hereditarias responsables de la fibrosis quística provocan un transporte defectuoso de $Cl^-$.

### Prevención y tratamiento

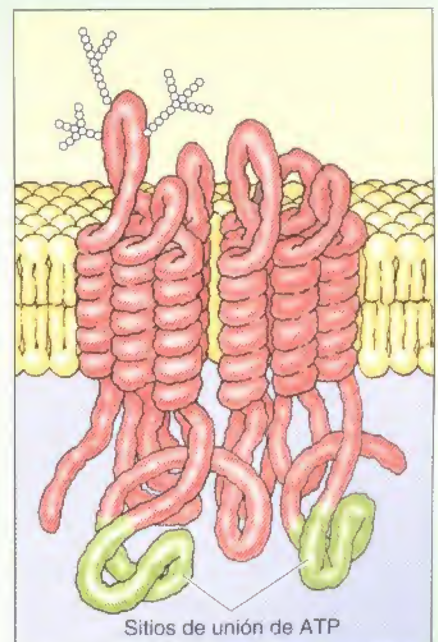
Como ocurre con otras enfermedades hereditarias, el aislamiento del gen de la fibrosis quística abre la posibilidad del estudio genético para identificar a los individuos portadores de alelos mutantes. En algunas poblaciones la frecuencia de portadores heterocigotos de genes mutantes es tan alta como de uno de cada 25 individuos, por lo que sería recomendable realizar un mapeo de la población total para identificar las parejas de riesgo y proporcionar un consejo genético. Además, el descubrimiento de que el CFTR actúa como un canal de $Cl^-$ ha llevado a nuevas aproximaciones al tratamiento. Una posibilidad es utilizar fármacos que estimulen la apertura de otros canales de $Cl^-$ en el epitelio afectado. Alternativamente, la terapia génica permite reemplazar los genes CFTR normales en el epitelio respiratorio de los pacientes con fibrosis quística.

El potencial de la terapia génica se apoya en experimentos que demuestran que la introducción de un gen CFTR normal en células cultivadas de pacientes de fibrosis quística es suficiente para restaurar la función del canal de $Cl^-$. La posible aplicación de la terapia génica para la fibrosis quística se facilita por el hecho de que las células epiteliales que revisten las vías respiratorias resultan accesibles a los aerosoles. Estudios con animales experimentales han demostrado que los vectores virales pueden transmitir ADNc de CFTR al epitelio respiratorio, y el primer ensayo humano de terapia génica para la fibrosis quística se inició en 1993. Los ensayos hasta la fecha han demostrado que el CFTR puede transportarse y expresarse de forma segura en las células epiteliales bronquiales de los pacientes con fibrosis quística. Hasta ahora, sin embargo, la eficiencia de la transferencia génica ha sido baja y la expresión del ADNc de CFTR transferido ha durado menos de un mes. De esta forma se han establecido las bases de una transferencia génica eficaz, pero todavía deben superarse obstáculos significativos para que se desarrolle un protocolo eficaz de terapia génica.

### Referencias

Collins, F.S.1992. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774-779.

Driskell, R. R. and J. F. Engelhardt. 2003. Current status of gene therapy for inherited lung disease. *Am. Rev. Physiol.* 65: 585-612.




Modelo para el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

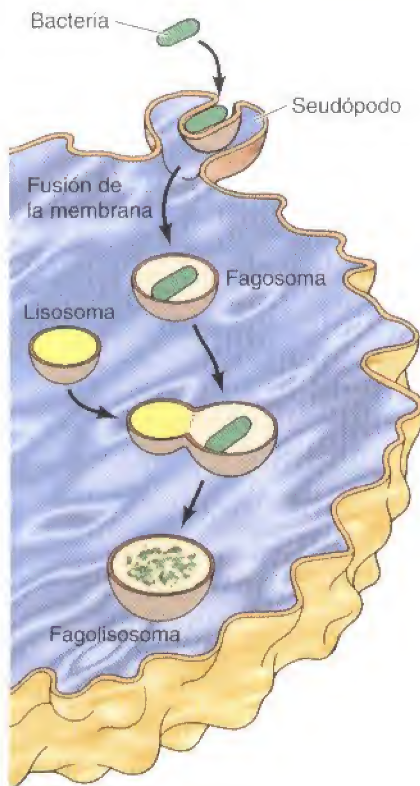



*Figura 12.35*
**Fagocitosis.** La unión de una bacteria a la superficie celular estimula la extensión de un seudópodo, que termina por engullir a la bacteria. La fusión de las membranas del seudópodo da como resultado la formación de una gran vesícula intracelular (un fagosoma). El fagosoma se fusiona con los lisosomas para formar un fagolisosoma, dentro del cual se digiere la bacteria ingerida.

dio circundante por un proceso distinto llamado **endocitosis**. En la endocitosis, el material que se va a introducir es rodeado por una porción de la membrana plasmática que luego se invagina para formar una vesícula que contiene el material ingerido. El término «endocitosis» fue acuñado por Christian deDuve en 1963 e incluía tanto la ingestión de partículas grandes (como bacterias) como la entrada de fluidos o macromoléculas en pequeñas vesículas. La primera de estas actividades se conoce como **fagocitosis** (acción celular de comer) y la otra como **pinocitosis** (acción celular de beber).

### *Fagocitosis*

Durante la fagocitosis las células engullen partículas grandes como bacterias, desechos celulares, o incluso células intactas (Fig. 12.35). La unión de la partícula a unos receptores sobre la superficie de la célula fagocítica dispara la extensión de seudópodos —un movimiento de la superficie celular basado en la actina, que se trató en el Capítulo 11—. Los seudópodos acaban rodeando a la partícula y sus membranas se funden para formar una gran vesícula intracelular (>0,25 $\mu$m de diámetro) llamada **fagosoma**. Los fagosomas entonces se fusionan con los lisosomas, dando lugar a los **fagolisosomas** en los que el material ingerido se digiere por la acción de las hidrolasas ácidas lisosomales (véase Cap. 9). Durante la maduración del fagolisosoma, alguna de las proteínas de membrana internalizadas se reciclan a la membrana plasmática, como se describe en la siguiente sección para la endocitosis mediada por receptor.

La ingestión por fagocitosis de partículas grandes desempeña papeles distintos en los diferentes tipos de células (Fig. 12.36). Muchas amebas emplean la fagocitosis para capturar partículas alimenticias, como bacterias u otros protozoos. En los animales pluricelulares los papeles principales de la fagocitosis son proporcionar una defensa contra microorganismos invasores y eliminar células viejas o dañadas del cuerpo. En los mamíferos la fagocitosis es la función principal de dos tipos de glóbulos blancos sanguíneos, macrófagos y neutrófilos, a los que se denomina frecuentemente «fagocitos profesionales». Tanto los macrófagos como los neutrófilos desempeñan un papel crítico en los sistemas de defensa del organismo, eliminando los microorganismos de los tejidos infectados. Un notorio ejemplo del alcance de esta actividad viene dado por los ma-

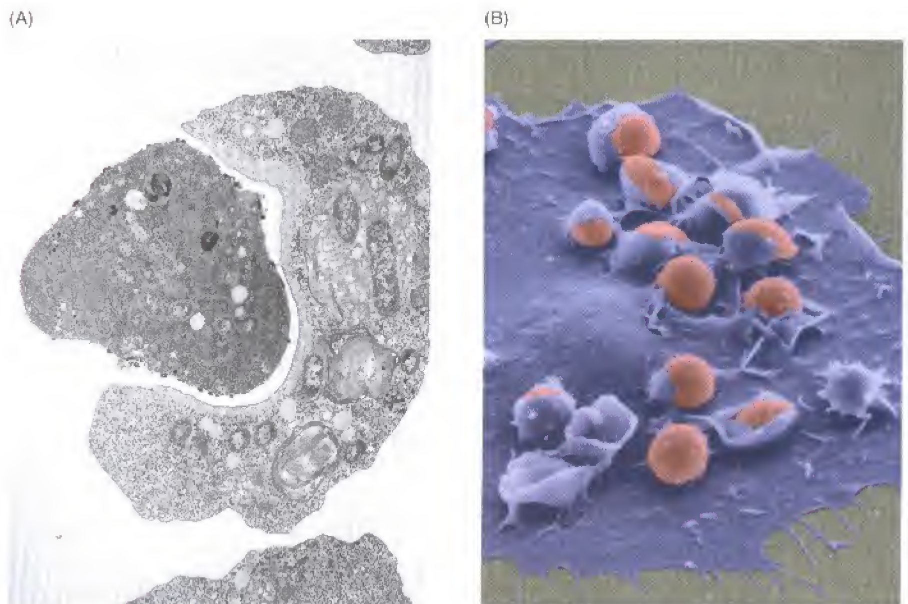



*Figura 12.36*
**Ejemplos de células fagocíticas.** (A) Ameba engullendo otro protista. (B) Macrófagos ingiriendo glóbulos rojos. Se ha añadido color a la micrografía. (A, R. N. Band y H. S. Pankratz/ Biological Photo Service; B, cortesía de Joel Swanson.)

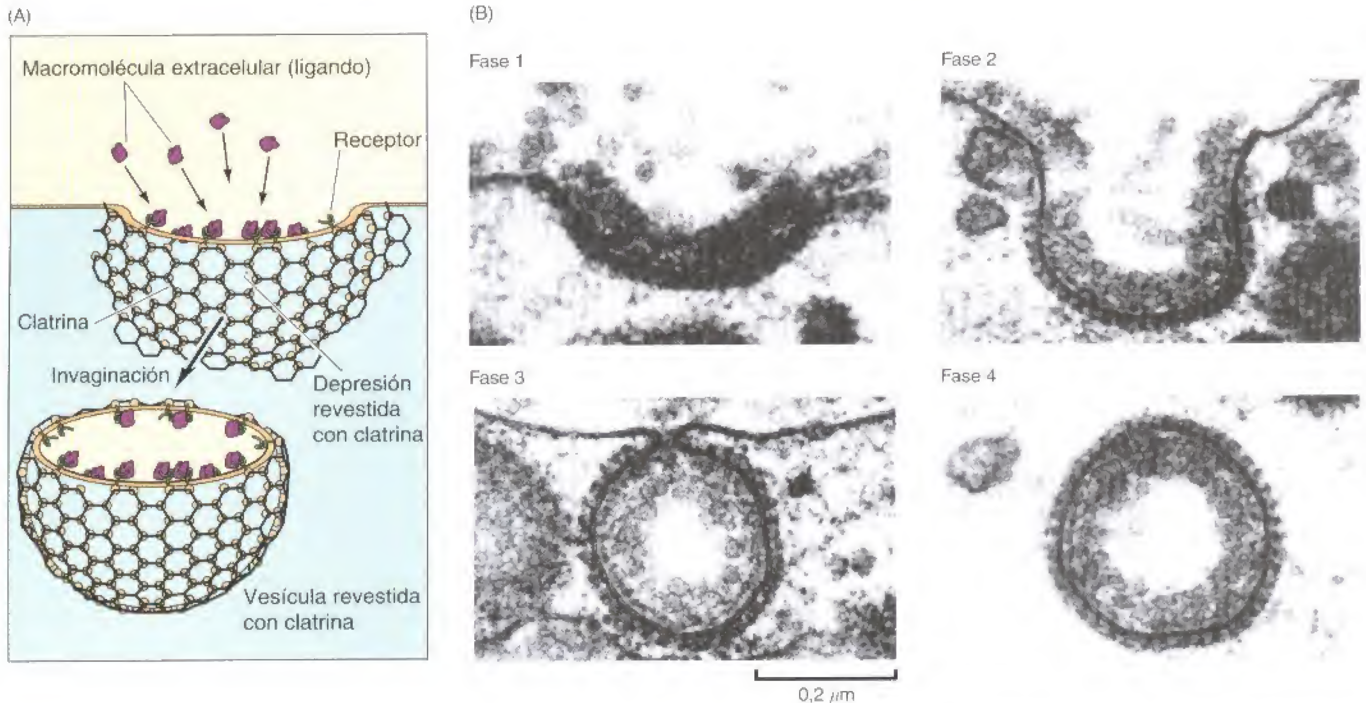



*Figura 12.37*
**Formación de una vesícula revestida con clatrina.** (A) Las macromoléculas extracelulares (ligandos) se unen a receptores de la superficie celular que se acumulan en depresiones revestidas con clatrina. Estas depresiones se invaginan desde la membrana plasmática para formar vesículas intracelulares revestidas con clatrina. (B) Micrografías electrónicas mostrando cuatro fases en la formación de una vesícula revestida con clatrina a partir de una depresión revestida con clatrina. (B, M. M. Perry, 1979. *J. Cell Science* 34: 266.)

crófagos del bazo e hígado humanos, los cuales son responsables de la destrucción diaria de más de $10^{11}$ células sanguíneas avejentadas.

## *Endocitosis mediada por receptor*

A diferencia de la fagocitosis, que desempeña solamente papeles especializados, la pinocitosis es un proceso común entre las células eucariotas. La forma mejor caracterizada de este proceso es la **endocitosis mediada por receptor**, que proporciona un mecanismo para la entrada selectiva de macromoléculas específicas (Fig. 12.37). En primer lugar, las macromoléculas que se van a introducir se unen a receptores específicos de la superficie celular. Estos receptores se acumulan en regiones especializadas de la membrana plasmática denominadas **depresiones revestidas con clatrina**. Estas depresiones se invaginan a partir de la membrana para formar pequeñas **vesículas revestidas con clatrina** que contienen los receptores y sus macromoléculas unidas (**ligandos**). A continuación, las vesículas revestidas con clatrina se fusionan con endosomas tempranos, y su contenido se distribuye bien para transportarse a los lisosomas o bien para reciclarse a la membrana plasmática.

La captura de colesterol por las células de mamíferos ha proporcionado un modelo clave para comprender la endocitosis mediada por receptor a nivel molecular. El colesterol se transporta a través del torrente sanguíneo en forma de partículas lipoproteínicas, la más común de las cuales se denomina **lipoproteína de baja densidad**, o **LDL**, (del inglés *low-density lipoprotein*) (Fig. 12.38). Los estudios en los laboratorios de Michael Brown y Joseph Goldstein demostraron que la entrada de LDL en las células de mamíferos requiere la unión de las LDL a un receptor específico de la superficie celular que se acumula en

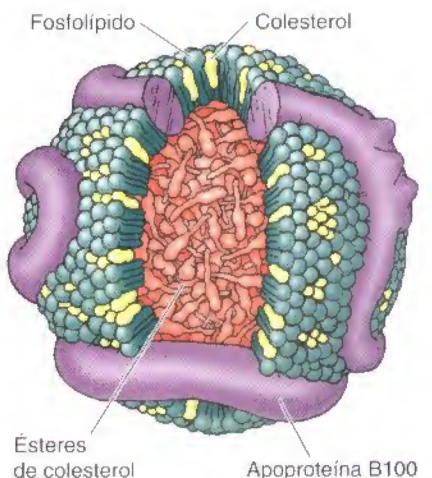
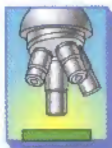



*Figura 12.38*
**Estructura de una LDL.** Cada partícula de LDL contiene aproximadamente 1.500 moléculas de ésteres de colesterol en un núcleo de naturaleza lipídica. El núcleo está rodeado por una cubierta que contiene 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípido, y una molécula de apoproteína B100.



## Experimento clave

# Receptor de las LDL

**Hipercolesterolemia familiar: unión defectuosa de lipoproteínas a fibroblastos en cultivo asociada a la regulación alterada de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa**

Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein

University of Texas Southwestern Medical School, Dallas

*Proceedings of the National Academy of Science USA, 1974, Volume 71, págs. 788-792*

## Contexto

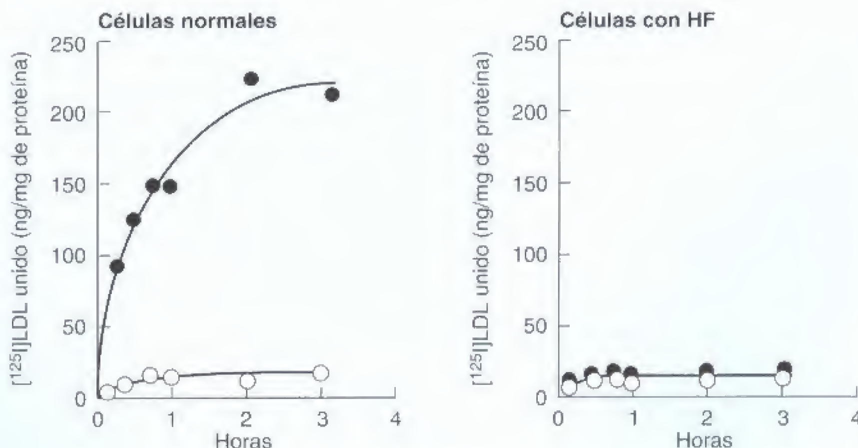
La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad genética en la que los pacientes tienen niveles muy elevados de colesterol sérico y sufren ataques de corazón prematuros. Michael Brown y Joseph Goldstein comenzaron a estudiar esta enfermedad en 1972 con la idea de que la superproducción de colesterol se debía a un defecto en los mecanismos de control que normalmente regulan la biosíntesis del colesterol. De forma consecuente con esta hipótesis, encontraron que al añadir LDL al medio de cultivo de fibroblastos normales humanos se inhibía la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), la enzima limitante en la ruta biosintética del colesterol. Por el contrario, la adición de LDL a las células de los pacientes con HF no afecta a la actividad de la HMG-CoA reductasa, lo que da como resultado la superproducción de colesterol por las células HF.

De manera quizás sorprendente, experimentos posteriores indicaron que esta anormalidad en la regulación de la HMG-CoA reductasa no se debía a una mutación en el gen de la HMG-CoA reductasa. En cambio, la regulación anormal de HMG-CoA reductasa parecía que era debida a la incapacidad de las células HF de obtener el colesterol a partir de las LDL. En 1974, Brown y Goldstein demostraron que la lesión de las células HF es un defecto en la unión de las LDL a un receptor de superficie celular. La identificación del receptor de LDL llevó a una serie de experimentos revolucionarios en los que Brown, Goldstein y sus colaboradores describieron la ruta de la endocitosis mediada por receptor.

## Experimentos

En su artículo de 1974, Brown y Goldstein publicaron los resultados de experimentos en los que investigaron la unión de LDL, marcado radiactivamente, a fibroblastos tanto de individuos normales como de pacientes con HF. Se añadió una pequeña cantidad de LDL radiactiva al medio de cultivo, y se determinaba la cantidad de radiactividad unida a las células después de tiempos variables de incubación (véase figura). Cantidades crecientes de LDL radiactiva se unían a las células normales en función del tiempo de incubación. Resultaba importante el hecho de que al añadir LDL no marcado en exceso disminuía la unión de LDL radiactiva, lo que indicaba que la unión se debía a una interacción específica de las LDL con un número limitado de sitios sobre la superficie celular. La especificidad de la interacción se corroboró al observarse que cantidades en exceso de otras lipoproteínas no interferían con la unión de las LDL.

En contraste con estos resultados en los fibroblastos normales, las células de pacientes HF no unían LDL radiactiva de manera específica. Por lo tanto, parecía ser que los fibroblastos normales poseían un receptor específico de LDL que estaba ausente o defectuoso en las células HF. Brown y Goldstein concluyeron que el defecto observado en la unión las LDL a las células HF «puede representar la alteración genética fundamental de esta enfermedad», justificando la incapacidad de la LDL de inhibir la HMG-CoA reductasa, y la superproducción resultante de colesterol. Experimentos adicionales mostraron que las LDL unidas a los fibroblastos normales están asociadas con la fracción de membrana de la célula, sugiriendo que el receptor de LDL es una proteína de superficie celular.

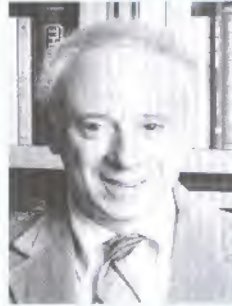



Transcurso de la unión de LDL radiactiva a células normales y con HF. Las células se incubaron con [$^{125}$I] LDL radiactiva en presencia (círculos blancos) o ausencia (círculos negros) de un exceso de LDL no marcado. Después se recogieron las células y se determinó la cantidad de LDL radiactiva fijada. Los datos se presentan como nanogramos de LDL unido por miligramo de proteína celular.

### *Receptor de las LDL (continuación)*

**Impacto**

Tras identificar al receptor de LDL, Brown y Goldstein demostraron que las LDL unidas a la superficie celular rápidamente se introducen y se degradan a colesterol libre en los lisosomas. En colaboración con Richard Anderson establecieron que el receptor de LDL se introduce mediante endocitosis desde depresiones revestidas. Además, sus estudios demostraron que el receptor de LDL se recicla a la membrana plasmática después de disociarse de su ligando dentro de la célula. Unos experimentos que se iniciaron con el objeto de entender la regulación de la biosíntesis del colesterol llevaron a descubrir la ruta principal por la cual las células eucariotas introducen macromoléculas específicas —un ejemplo notorio de la forma en la que la ciencia y los científicos pueden avanzar en nuevas direcciones no previstas—.



Joseph Goldstein



Michael Brown

depresiones revestidas de clatrina y que se introduce por endocitosis. Como se describe en la sección siguiente, el receptor posteriormente se recicla a la membrana plasmática mientras que la LDL se transporta a los lisosomas, donde se libera el colesterol para ser utilizado por la célula.

Los datos reveladores acerca de este proceso surgieron a partir de estudios de pacientes con una enfermedad hereditaria conocida como hipercolesterolemia familiar. Los pacientes con esta enfermedad presentan niveles muy altos de colesterol sérico y sufren ataques cardíacos prematuros. Brown y Goldstein hallaron que las células de estos pacientes eran incapaces de introducir LDL desde los fluidos extracelulares, lo que causaba que se acumulara un elevado nivel de colesterol en la circulación. Experimentos posteriores demostraron que las células de los individuos normales poseen un receptor para las LDL que se acumula en las depresiones revestidas, y que la hipercolesterolemia familiar se debe a mutaciones congénitas del receptor de LDL. Estas mutaciones son de dos tipos. Las células de la mayoría de los pacientes con hipercolesterolemia familiar sencillamente son incapaces de unir LDL, lo que demuestra que se necesita un receptor específico de la superficie celular para la entrada de LDL. Además, se identificaron algunos pacientes en cuyas células se había unido LDL pero eran incapaces de internalizarla. Los receptores de LDL de estos pacientes no se acumulaban en las depresiones revestidas, lo que proporcionaba una evidencia directa del papel central de las depresiones revestidas en la endocitosis mediada por receptor.

Las mutaciones que impiden al receptor de LDL acumularse en las depresiones revestidas se localizan en la cola citoplasmática del receptor y pueden ser tan sutiles como un cambio de tirosina por cisteína (Fig. 12.39). Estudios posteriores han definido la señal de internalización del receptor de LDL como una secuencia de seis aminoácidos, incluyendo la tirosina esencial. En las colas citoplasmáticas de otros receptores captados a través de depresiones revestidas de clatrina, se encuentran señales de internalización similares, incluyendo con frecuencia restos de tirosina. Estas señales de internalización se unen a proteínas adaptadoras, que a su vez se unen a la clatrina en el lado citosólico de la membrana, de manera parecida a como se formaban las vesículas revestidas de clatrina durante el transporte de hidrolasas lisosómicas desde la red *trans* del Golgi (véase Fig. 9.33). La clatrina se ensambla en una estructura a modo de cesta que distorsiona la membrana, formando depresiones invaginadas (Fig. 12.40). Una proteína de unión a GTP, denominada dinamina, se dispone en

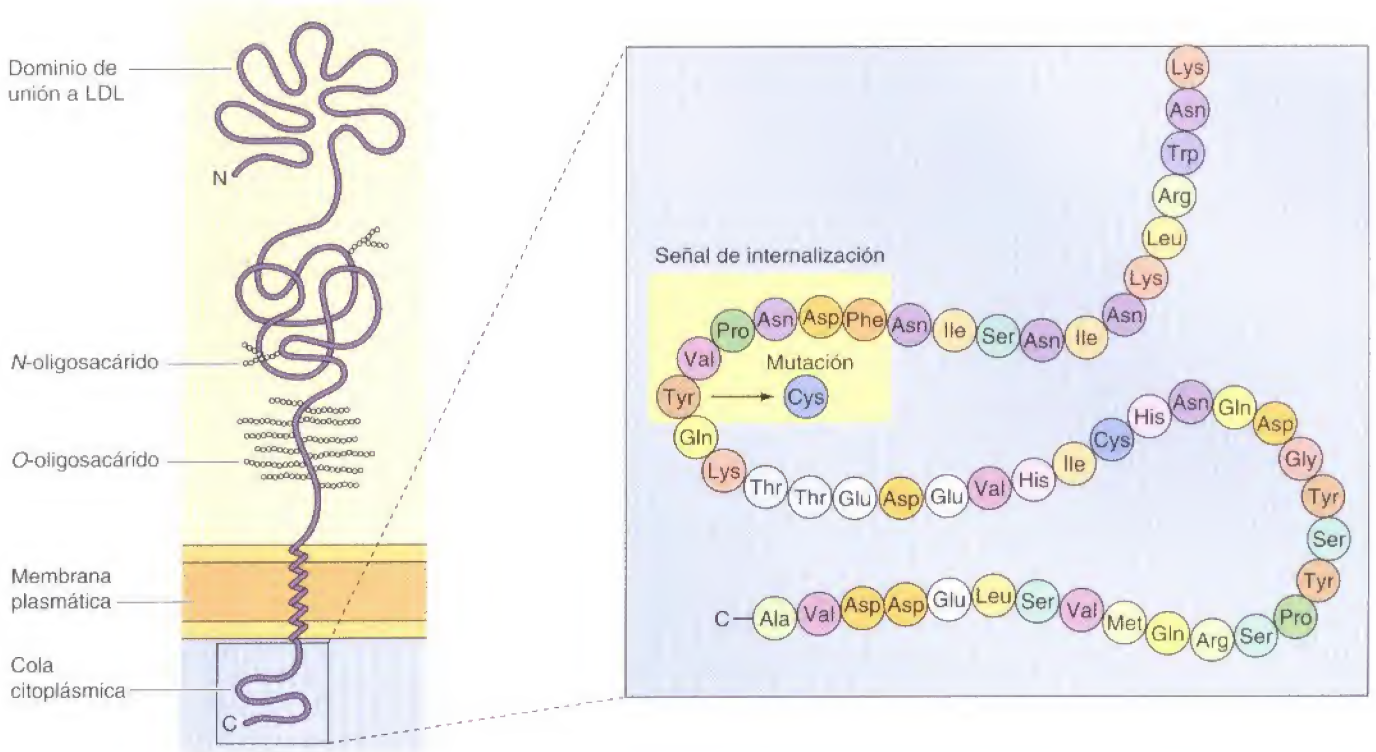
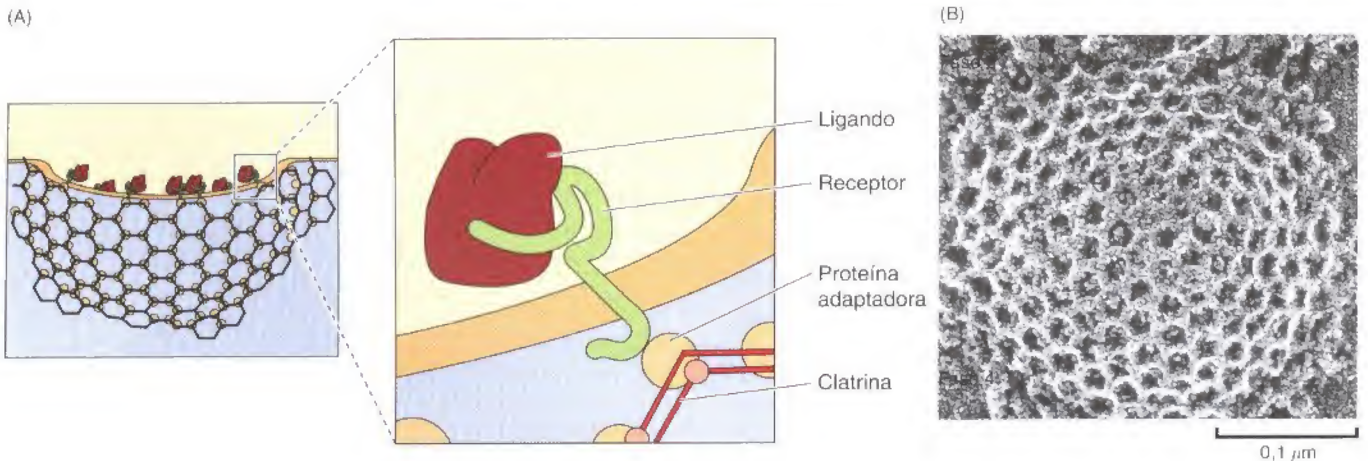



*Figura 12.39*
**Receptor de LDL.** El receptor de LDL incluye 700 aminoácidos extracelulares, una α-hélice transmembrana de 22 aminoácidos y una cola citoplásmica de 50 aminoácidos. Los 292 aminoácidos del extremo N-terminal constituyen el dominio de unión a LDL. Seis aminoácidos dentro de la cola citoplásmica definen la señal de internalización, que se reconoció por vez primera porque la mutación que determina el cambio de Tyr por Cys en un caso de hipercolesterolemia familiar impide que el receptor se acumule en las depresiones revestidas.

anillos alrededor del cuello de estas depresiones invaginadas, lo que conduce a la liberación de las vesículas revestidas dentro de la célula.

La endocitosis mediada por receptor es una actividad característica de la membrana citoplasmática de las células eucariotas. Se han encontrado más de 20 receptores diferentes que se introducen de forma selectiva por esta ruta. También se incorpora fluido extracelular a las vesículas revestidas según se invaginan desde la membrana plasmática, por lo que la endocitosis mediada

*Figura 12.40*
**Formación de depresiones revestidas de clatrina.** (A) Unas proteínas adaptadoras se unen tanto a la clatrina como a las señales de internalización presentes en las colas citoplasmáticas de los receptores. (B) Micrografía electrónica de una depresión revestida de clatrina mostrando la estructura en cesta de la red de clatrina. (B, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine.)



(A)




(B)

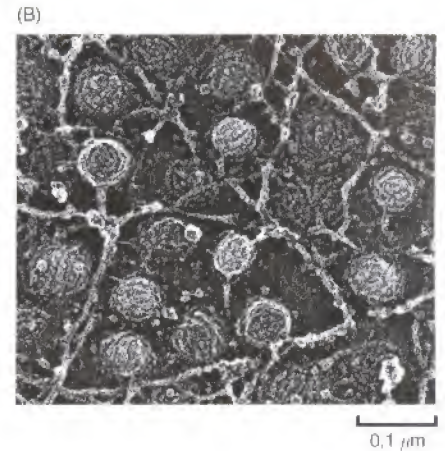



*Figura 12.41*
**Caveolas.** Micrografías electrónicas de caveolas. (A, cortesía de R. G. W. Anderson/University of Texas Southwestern Medical School-Dallas; B, cortesía de John E. Heuser, Washington University School of Medicine.)

por receptor provoca la entrada no selectiva del fluido extracelular y de sus contenidos (**endocitosis en fase fluida**), además de la introducción de macromoléculas específicas. Las depresiones revestidas suelen ocupar del 1 % al 2 % de la superficie de la membrana plasmática y se estima que tienen una vida media de uno a dos minutos. Partiendo de estas cifras, se calcula que la endocitosis mediada por receptor produce la internalización de una superficie celular equivalente a la totalidad de la membrana plasmática aproximadamente cada dos horas.

Varios estudios indican que las células también poseen vías de endocitosis independientes de clatrina. Por ejemplo, los fluidos y algunas moléculas unidas a la membrana continúan siendo endocitadas bajo condiciones experimentales que inhiben la endocitosis desde las depresiones revestidas por clatrina. Una ruta de endocitosis independiente de clatrina implica la entrada de moléculas en pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (de 50 a 80 nm de diámetro) denominadas **caveolas** (Fig. 12.41). Además, unas vesículas grandes (0,15 a 5,0 μm de diámetro) pueden intervenir en la entrada de fluidos en un proceso conocido como **macropinocitosis**. Por lo tanto, mientras que la endocitosis dependiente de clatrina proporciona claramente una ruta principal para la entrada tanto de fluidos como de macromoléculas específicas, las células también pueden utilizar varios mecanismos posibles independientes de la clatrina.

## *Tráfico de proteínas en la endocitosis*

Tras su internalización, las vesículas revestidas de clatrina se despojan rápidamente de sus revestimientos y se fusionan con **endosomas** tempranos, que son vesículas con extensiones tubulares que se localizan en la periferia de la célula. La especificidad de la fusión de las vesículas endocíticas con los endosomas viene determinada por proteínas Rab de unión a GTP y por la interacción entre pares complementarios de proteínas transmembrana de la vesícula y de la membrana diana (v-SNAREs y t-SNAREs), como se describió en el Capítulo 9. Los endosomas tempranos son un compartimento de clasificación, desde el cual las moléculas absorbidas por endocitosis son o bien recicladas a la membrana plasmática o bien transportadas a los lisosomas para ser degradadas. Además, los endosomas tempranos de las células polarizadas pueden transferir las proteínas endocitadas a diferentes dominios de la membrana plasmática —por ejemplo, entre los dominios apical y basolateral de las células epiteliales—.

Una característica importante de los endosomas tempranos es que mantienen un pH interno ácido (entre 6,0 y 6,2) como resultado de la acción de una bomba de $H^+$ en la membrana. Este pH ácido provoca que muchos ligandos se

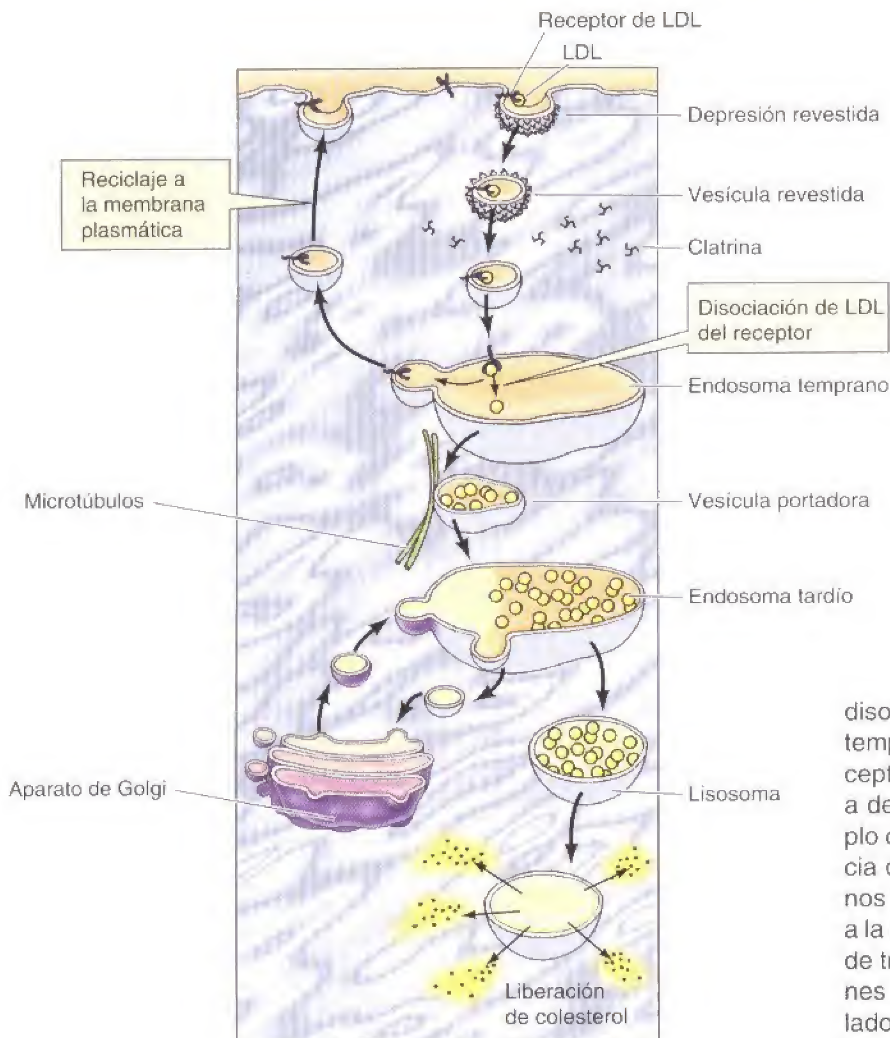



*Figura 12.42*
**Clasificación en los endosomas tempranos.** La LDL unida a su receptor se internaliza en vesículas revestidas de clatrina, que se desprenden de sus revestimientos y se fusionan con endosomas tempranos. Con el pH ácido de los endosomas tempranos, la LDL se disocia de su receptor, y los materiales endocitados se clasifican para su degradación en los lisosomas o su reciclaje a la membrana plasmática. La LDL se transporta desde los endosomas tempranos a endosomas tardíos en grandes vesículas transportadoras que migran a lo largo de los microtúbulos. Las vesículas transportadoras que portan hidrolasas lisosómicas desde el aparato de Golgi se fusionan con los endosomas tardíos, que maduran a lisosomas donde la LDL se degrada y se libera el colesterol. Por otro lado, el receptor de LDL se recicla desde los endosomas tempranos a la membrana plasmática.

disocien de sus receptores en el endosoma temprano. Tras este desacoplamiento, los receptores y sus ligandos pueden transportarse a destinos intracelulares diferentes. Un ejemplo clásico lo proporciona la LDL, que se disocia de su receptor en los endosomas tempranos (Fig. 12.42). El receptor entonces retorna a la membrana plasmática mediante vesículas de transporte que surgen a partir de extensiones tubulares de los endosomas. Por otro lado, la LDL se transporta (junto con otros contenidos solubles del endosoma) a los lisosomas, donde su degradación libera al colesterol.

Reciclarse a la membrana plasmática es el destino principal de las proteínas de membrana captadas por endocitosis mediada por receptor, y muchos receptores (como el receptor de LDL) se devuelven a la membrana plasmática tras disociarse de sus ligandos en los endosomas tempranos. El reciclaje de estos receptores supone la continua internalización de sus ligandos. Por ejemplo, cada receptor de LDL realiza un ciclo de ida y vuelta desde la membrana plasmática a los endosomas aproximadamente cada 10 minutos. La importancia de la ruta de reciclaje se muestra por la magnitud del tráfico de la membrana que resulta de la endocitosis. Como ya hemos reseñado, aproximadamente el 50 % de la membrana plasmática se internaliza cada hora por endocitosis mediada por receptor, por lo que debe ser reemplazada a una velocidad equivalente. Este reemplazamiento se debe, en su mayor parte, al reciclaje del receptor; cada hora solamente se sintetiza *de novo* un 5 % de la superficie celular.

Los ligandos y las proteínas de membrana destinados a degradarse en los lisosomas se transportan desde endosomas tempranos a endosomas tardíos, que se localizan cerca del núcleo (véase Fig. 12.42). El transporte desde los endosomas tempranos a los tardíos viene mediado por el movimieΓnto de grandes vesículas transportadoras endocíticas a lo largo de los microtúbulos. Los endosomas tardíos son más ácidos que los endosomas tempranos (pH entre 5,5 y 6,0) y, como se describió en el Capítulo 9, son capaces de fusionarse con vesículas transportadoras que portan hidrolasas lisosómicas desde el aparato de Golgi. Entonces los endosomas tardíos maduran a lisosomas cuando ad-

quieren todo un complemento de enzimas lisosómicas y alcanzan mayor acidez (pH sobre 5). Dentro de los lisosomas, los materiales endocitados se degradan por la acción de las hidrolasas ácidas.

Aunque muchos receptores (como el receptor de LDL) se reciclan a la membrana plasmática, otros siguen destinos diferentes. Algunos son transportados a los lisosomas y degradados junto con sus ligandos. Por ejemplo, los receptores superficiales celulares de varios factores de crecimiento (descritos en el próximo Capítulo), se introducen tras la unión del factor de crecimiento y terminan siendo degradados en los lisosomas. El resultado de este proceso es la eliminación de los complejos receptor-ligando de la membrana plasmática, lo que implica el final de la respuesta de la célula a una estimulación por un factor de crecimiento —fenómeno conocido como **regulación por disminución del receptor (*receptor down-regulation*)**.

Un tipo especializado de reciclaje desde los endosomas desempeña un papel importante en la transmisión de los impulsos nerviosos a través de las sinapsis (Fig. 12.43). Como se describió anteriormente en este capítulo, la llegada de un potencial de acción a la terminación de la mayoría de las neuronas es una señal para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, liberandose los neurotransmisores que transmiten la señal a las células postsinápticas. Entonces, las vesículas sinápticas vacías se recuperan a partir de la membrana plasmática mediante vesículas recubiertas de clatrina, que se fusionan con los endosomas tempranos. Las vesículas sinápticas se regeneran directamente a partir de los endosomas. Acumulan un nuevo suministro de neurotransmisores y retornan a la membrana plasmática, quedando preparadas para el próximo ciclo de transmisión sináptica.

En las células polarizadas (p. ej., células epiteliales), los receptores internalizados también se pueden transferir a través de la célula al dominio opuesto de la membrana plasmática —un proceso llamado **transcitosis**. Por ejemplo, un receptor endocitado desde el dominio basolateral de la membrana plasmática puede ser seleccionado en los endosomas tempranos para transportarse a la membrana apical. En algunas células éste es un mecanismo importante de clasificación de las proteínas de membrana (Fig. 12.44). En vez de ser clasificadas en la red *trans* Golgi para su entrega en los dominios apical o basolateral (véase Fig. 9.29), las proteínas se dirigen inicialmente a la membrana basolateral. Las proteínas destinadas a la membrana apical se transfieren después a su lugar por transcitosis. Además, la transcitosis proporciona un mecanismo para la transfe-

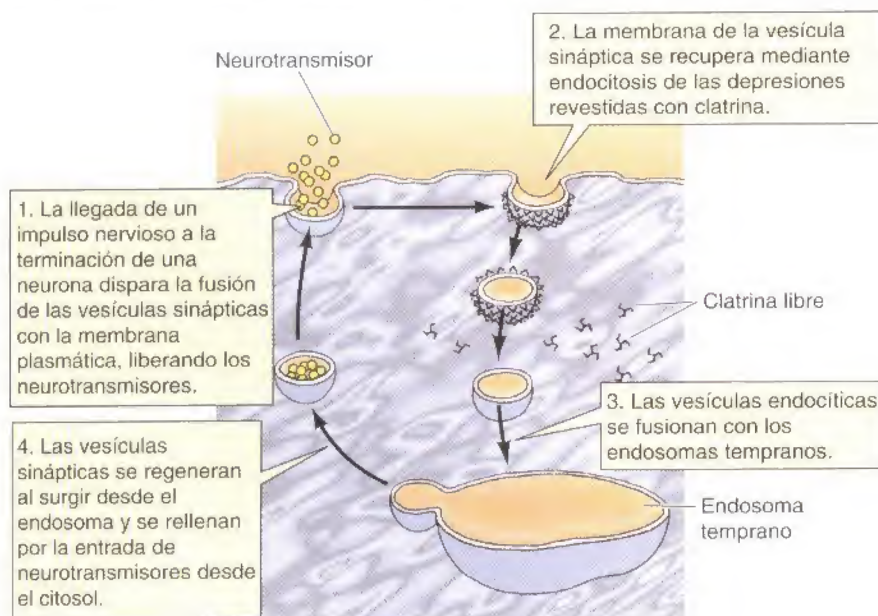



*Figura 12.43*
**Reciclaje de vesículas sinápticas.**

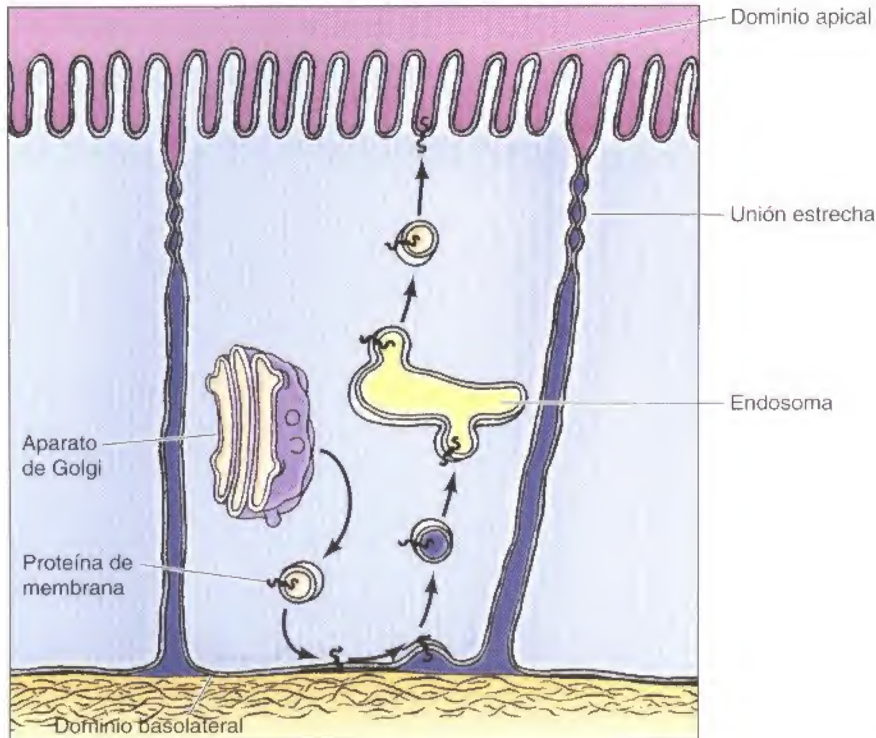



*Figura 12.44*
**Clasificación de las proteínas por transcitosis.** Una proteína destinada al dominio apical de la membrana plasmática se transporta en primer lugar desde el aparato de Golgi al dominio basolateral. Después es endocitada y transportada de forma selectiva al dominio apical desde los endosomas tempranos.

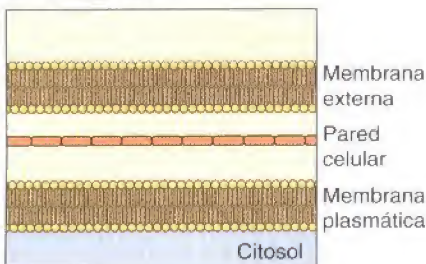
rencia de macromoléculas extracelulares a través de capas de células epiteliales. Por ejemplo, muchos tipos de células epiteliales transportan anticuerpos desde la sangre a varios fluidos secretados, como la leche. Los anticuerpos se unen a sus receptores en la superficie basolateral y mediante transcitosis se dirigen, junto con sus receptores, a la superficie apical. Entonces se escinden los receptores liberándose los anticuerpos a las secreciones extracelulares.

## Paredes celulares y matriz extracelular

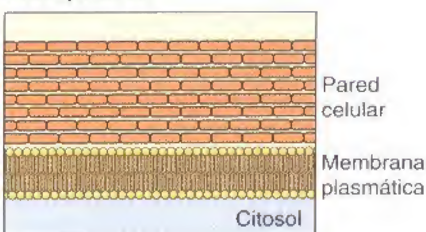
Aunque el límite de la célula viene definido por la membrana plasmática, muchas células se encuentran rodeadas de una formación insoluble de macromoléculas secretadas. Las células de las bacterias, hongos, algas, y plantas superiores están rodeadas por una pared celular rígida, que es una parte integral de la célula. Las células animales, aunque no están encerradas en paredes celulares, están asociadas íntimamente en los tejidos con una matriz extracelular compuesta por proteínas y polisacáridos. La matriz extracelular no sólo proporciona un soporte estructural a las células y a los tejidos, sino que también desempeña papeles importantes en la regulación del comportamiento de las células en los organismos pluricelulares.

*Figura 12.45*
**Paredes celulares bacterianas.** La membrana plasmática de las bacterias Gram-negativas está rodeada por una pared celular delgada por debajo de la membrana externa. Las bacterias Gram-positivas carecen de la membrana externa y tienen una pared celular gruesa.

**Gram-negativa**



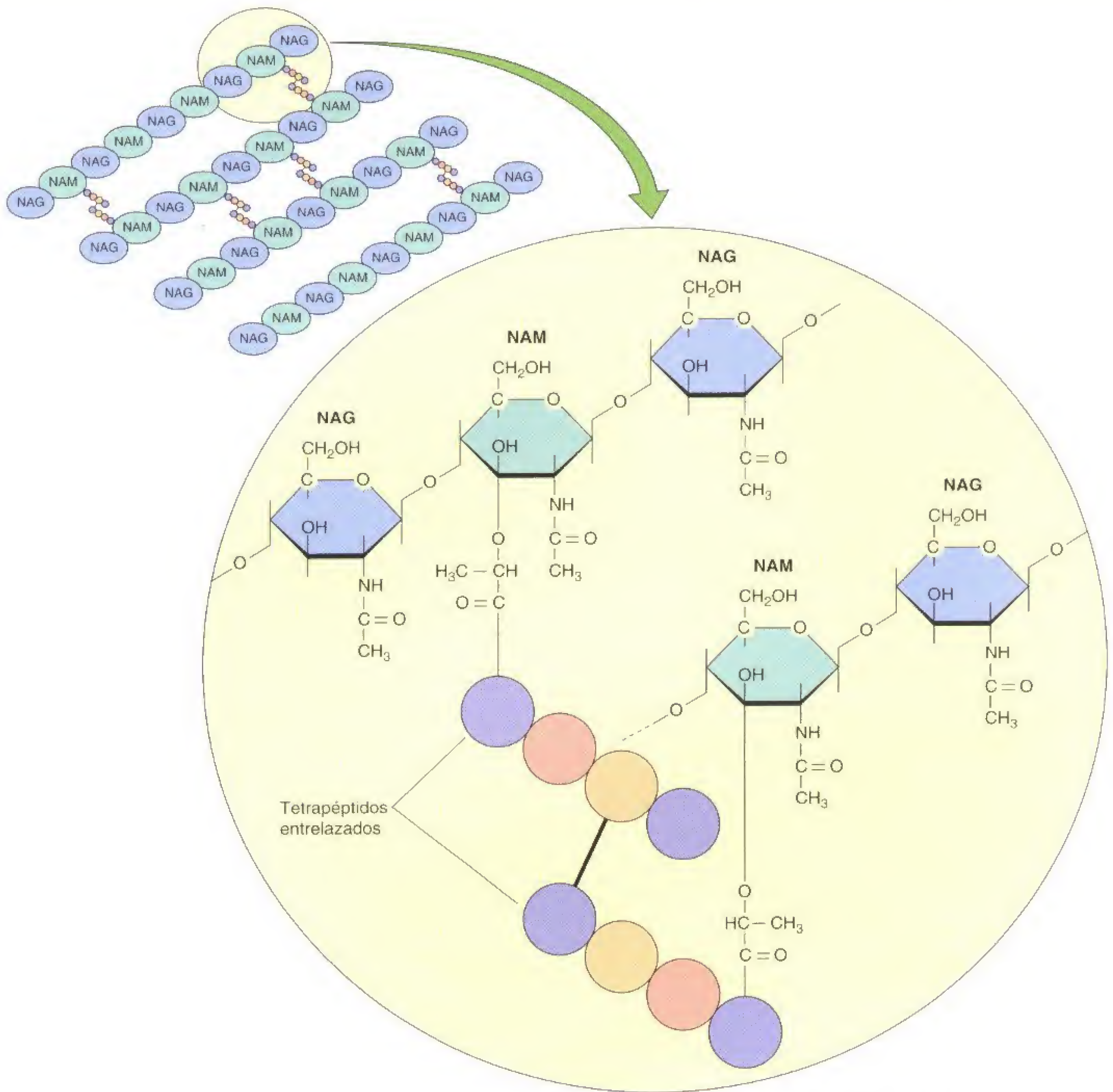

**Gram-positiva**




### *Paredes celulares bacterianas*

Las paredes celulares rígidas de las bacterias determinan la forma de la célula y previenen que la célula estalle como consecuencia de la presión osmótica. La estructura de sus paredes celulares divide a las bacterias en dos amplios grupos que pueden distinguirse por un método de tinción conocida como la tinción Gram, desarrollada por Christian Gram en 1884 (Fig. 12.45). Como ya se mencionó en este capítulo, las bacterias Gram-negativas (como *E. coli*) tienen un sistema de membrana doble en el que la membrana plasmática está rodeada por una membrana externa permeable. Estas bacterias tienen una pared celular delgada localizada entre sus membranas interna y externa. Por el contrario, las bacterias Gram-positivas (como el patógeno humano común *Staphylococcus aureus*) presentan solamente una única membrana plasmática, que está rodeada de una pared celular mucho más gruesa.

A pesar de estas diferencias estructurales, el principal componente de las paredes celulares tanto de las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas es el **peptidoglicano** (Fig. 12.46) que está constituido por cadenas lineales de polisacáridos, entrelazadas por péptidos cortos. Debido a su estructura entrelazada, el peptidoglicano forma una cubierta covalente fuerte alrededor de toda la célula bacteriana. Es interesante destacar que lo que les hace a las bacterias vulnerables frente a

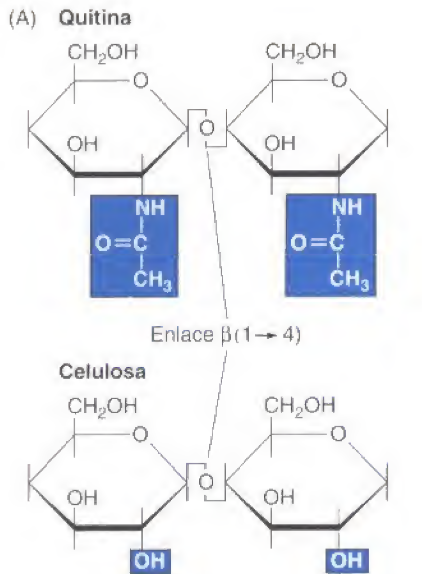



algunos antibióticos es la estructura característica de sus paredes celulares. La penicilina, por ejemplo, inhibe la enzima responsable de formar los puentes de unión cruzados entre las diferentes hebras de peptidoglicano, interfiriendo de esta manera en la síntesis de la pared celular y bloqueando el crecimiento bacteriano.

*Figura 12.46*
**Peptidoglicano de *E. coli*.** Las cadenas de polisacáridos están constituidas por restos de *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) alternantes, unidos por enlaces glicosídicos $\beta$ $(1 \rightarrow 4)$. Las cadenas paralelas se entrelazan por tetrapéptidos unidos a los restos de NAM. Los aminoácidos que forman los tetrapéptidos varían en las distintas especies bacterianas.

## *Paredes celulares vegetales*

A diferencia de las de las bacterias, las paredes celulares de los eucariotas (incluyendo hongos, algas, y plantas superiores) se componen principalmente de polisacáridos (Fig. 12.47). El polisacárido estructural fundamental de las paredes celulares de los hongos es la **quitina** (un polímero de restos de *N*-acetilglucosamina), que también forma el exoesqueleto de los artrópodos (p. ej., los caparazones de los cangrejos). Las paredes celulares de la mayoría de las algas y de las plantas superiores se componen principalmente de **celulosa**, que



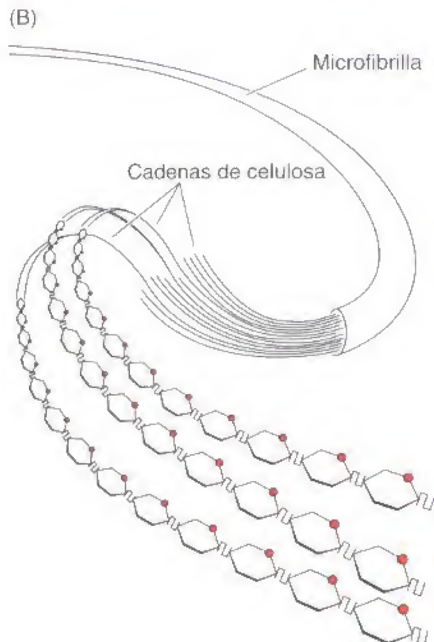




*Figura 12.47*
**Polisacáridos de paredes celulares de hongos y de vegetales.** (A) La quitina (el polisacárido principal de la pared celular de los hongos) es un polímero lineal de restos de *N*-acetilglucosamina, mientras que la celulosa es un polímero lineal de glucosa. Los monómeros de carbohidrato se unen por enlaces $\beta$ (1→4), permitiendo a los polisacáridos formar cadenas largas y rectas. (B) Las cadenas paralelas de celulosa se asocian para formar microfibrillas.

es el polímero más abundante de la tierra. La celulosa es un polímero lineal de restos de glucosa que suele estar constituido por más de 10.000 monómeros de glucosa. Los restos de glucosa se unen por enlaces $\beta$ (1 → 4), lo que permite al polisacárido formar largas cadenas rectas. Varias docenas de dichas cadenas se asocian en paralelo unas con otras para formar **microfibrillas de celulosa** que pueden alcanzar una longitud de varias micras.

En el interior de la pared celular, las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz compuesta por proteínas y otros dos tipos de polisacáridos: **hemicelulosas** y **pectinas** (Fig. 12.48). Las hemicelulosas son polisacáridos altamente ramificados que están unidos a la superficie de las microfibrillas de celulosa por enlaces de hidrógeno. Esto entrelaza las microfibrillas de celulosa dando lugar a una red de moléculas fibrosas y resistentes, que es la responsable de la resistencia mecánica de las paredes celulares vegetales. Las pectinas son polisacáridos ramificados que contienen un gran número de restos de ácido galacturónico cargados negativamente. Debido a estas múltiples cargas negativas, las pectinas se unen a iones cargados positivamente (como el $Ca^{2+}$) y atrapan molé-

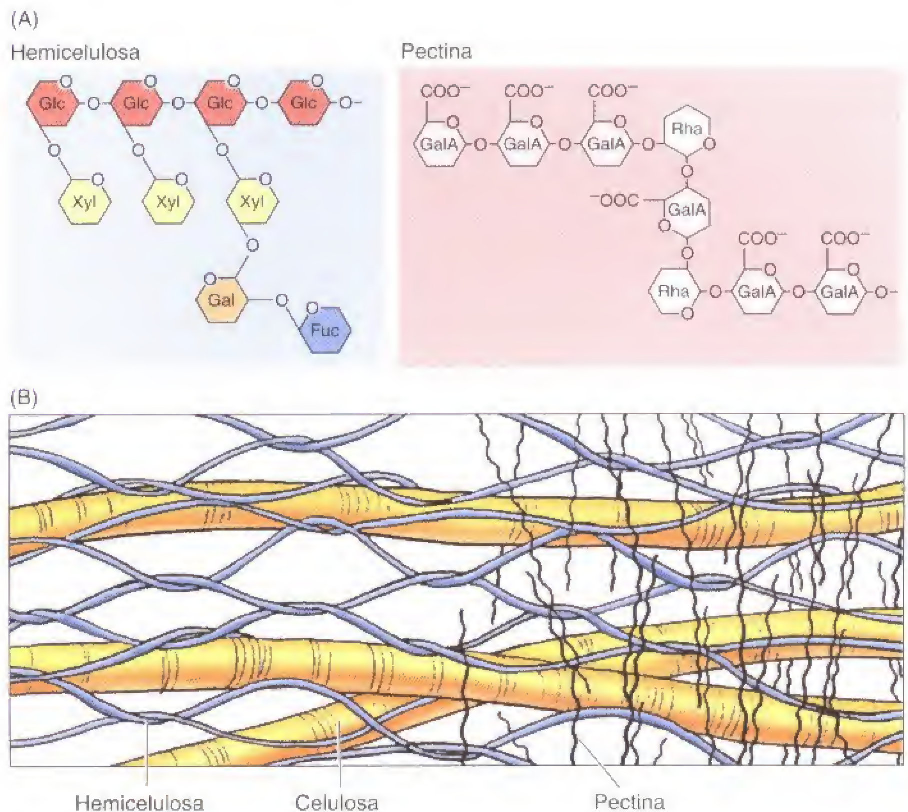



*Figura 12.48*
**Modelo de una pared celular vegetal.** (A) Estructuras de una hemicelulosa (xiloglucano) y de una pectina (ramnogalacturano) representativas. El xiloglucano está constituido por un esqueleto de restos de glucosa (Glc) con cadenas laterales de xilosa (Xyl), galactosa (Gal) y fucosa (Fuc). El esqueleto del ramnogalacturano contiene ácido galacturónico (GalA) y restos de ramnosa (Rha), a los cuales se unen también numerosas cadenas laterales. (B) Las hemicelulosas se unen a la superficie de las microfibrillas de celulosa formando una red fibrosa que se encuentra embebida en una matriz gelatinosa de pectinas.

culas de agua para formar geles. Un ejemplo ilustrativo de sus propiedades gelificantes lo muestra el hecho de que las mermeladas y las gelatinas se producen añadiendo pectinas al zumo de frutas. En la pared celular, las pectinas forman una red gelatinosa que está unida con las microfibrillas de celulosa entrelazadas. Además, las paredes celulares contienen varias glicoproteínas que se incorporan a la matriz y que se cree que proporcionan un mayor soporte estructural.

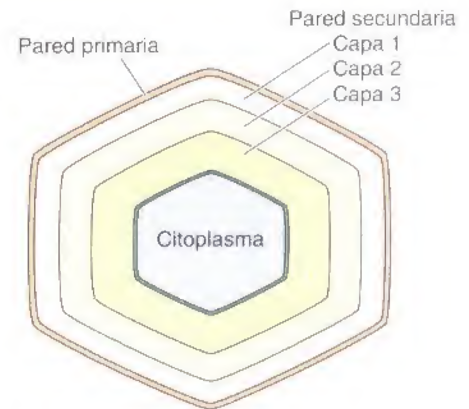
Tanto la estructura como la función de la pared celular varían a medida que las células vegetales se desarrollan. La pared de las células vegetales en crecimiento (denominada **pared celular primaria**) es relativamente delgada y flexible, lo que permite a la célula crecer en tamaño. Una vez que las células han cesado su crecimiento, suelen desarrollar una **pared celular secundaria** entre la membrana plasmática y la pared celular primaria (Fig. 12.49). Esta pared celular secundaria, que es más ancha y más rígida que la pared primaria, es particularmente importante en aquellos tipos celulares responsables de conducir el agua y de proporcionar resistencia mecánica a la planta.

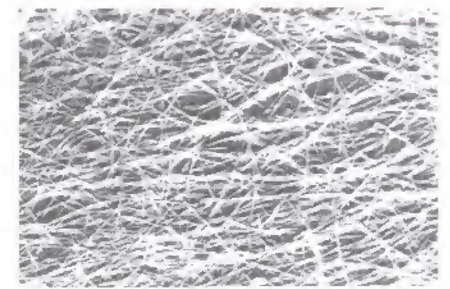
Las paredes celulares primaria y secundaria se diferencian en la composición así como en el grosor. La pared celular primaria contiene, aproximadamente, cantidades iguales de celulosa, hemicelulosa, y pectina. Sin embargo, la pared secundaria, que es más rígida, generalmente carece de pectina y contiene entre el 50 % y el 80 % de celulosa. Muchas paredes secundarias además están reforzadas por **lignina**, un polímero complejo de restos fenólicos que es en gran medida responsable de la resistencia y de la densidad de la madera. La orientación de las microfibrillas de celulosa también es diferente en las paredes celulares primaria y secundaria. Las fibras de celulosa de la pared primaria se encuentran distribuidas al azar, mientras que las de la pared secundaria están muy ordenadas (véase Fig. 12.49). La pared secundaria se suele organizar en capas en las que las fibras de celulosa tienen orientaciones diferentes, formando una estructura laminar que incrementa enormemente la resistencia de la pared celular.

Una de las funciones críticas de las paredes celulares vegetales es impedir que la célula se hinche como resultado de la presión osmótica. A diferencia de las células animales, las células vegetales no mantienen un equilibrio osmótico entre su citosol y los fluidos extracelulares. Como consecuencia, la presión osmótica dirige continuamente el flujo de agua hacia el interior de la célula. Las células vegetales toleran este flujo de agua hacia el interior debido a que sus paredes celulares rígidas impiden que la célula se hinche y estalle. En su lugar, se genera una presión hidrostática interna (llamada **presión de turgencia**), que acaba por igualar a la presión osmótica e impide que el agua siga entrando.

La presión de turgencia es la principal responsable de la rigidez de los tejidos vegetales, como resulta aparente tras la observación de una planta deshidratada y marchita. Además, la presión de turgencia es el fundamento de un mecanismo de crecimiento celular que es único en las plantas. Concretamente, las células vegetales suelen crecer debido a la entrada de agua, sin sintetizar nuevos componentes citoplasmáticos (Fig. 12.50). Este mecanismo de crecimiento celular está señalizado por hormonas vegetales (**auxinas**) que debilitan una región de la pared celular, lo que permite a la presión de turgencia dirigir la expansión de la célula en esa dirección. A medida que esto ocurre, el agua que fluye al interior de la célula se acumula en una gran vacuola central, por lo que la célula crece sin incrementar el volumen de su citosol. Este tipo de crecimiento puede dar como resultado un aumento entre 10 y 100 veces del tamaño de las células vegetales durante el desarrollo. Cómo las células vegetales modifican sus paredes celulares sólo se está empezando a comprender, pero puede implicar las proteínas quinasas transmembranales denominadas quinasas asociadas a la pared, que se cree que interaccionan con proteínas específicas o con polisacáridos de pectina presentes en la pared celular.

A medida que las células crecen, se van depositando nuevos componentes de la pared celular por fuera de la membrana plasmática. Los componentes de la matriz, incluyendo hemicelulosas y pectinas, se sintetizan en el aparato de



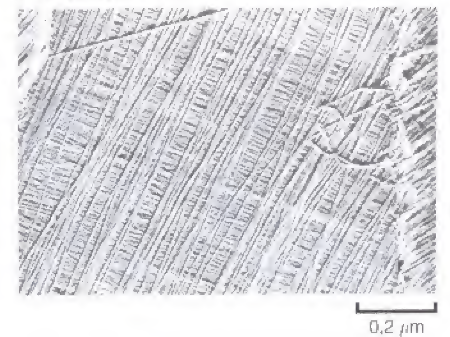




*Figura 12.49*
**Paredes celulares primaria y secundaria.** La pared celular secundaria se dispone entre la pared celular primaria y la membrana plasmática. La pared secundaria suele estar constituida por tres capas, que difieren en la orientación de sus microfibrillas de celulosa. Las micrografías electrónicas muestran las microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria y secundaria. (Pared primaria, cortesía de F. C. Steward; pared secundaria, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.)

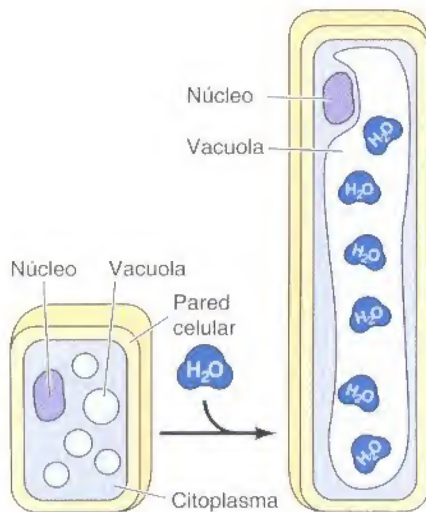



*Figura 12.50*
**Crecimiento de las células vegetales.** La presión de turgencia dirige la expansión de las células vegetales mediante la entrada de agua, que se acumula en una gran vacuola central.

Golgi y son secretados. La celulosa, sin embargo, es sintetizada por un complejo enzimático de la membrana plasmática (**celulosa sintetasa**). En las células en crecimiento, las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas se depositan formando un ángulo recto con la dirección de la elongación celular —una orientación que se cree que desempeña un papel importante en la determinación de la dirección de la expansión celular (Fig. 12.51). Es interesante destacar que las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares en crecimiento se disponen en paralelo a los microtúbulos corticales subyacentes a la membrana plasmática. Estos microtúbulos parece que definen la orientación de las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas, posiblemente determinando la dirección del movimiento de los complejos de la celulosa sintetasa de la membrana. De esta manera, los microtúbulos corticales definen la dirección del crecimiento de la pared celular, que a su vez determina la dirección del crecimiento celular y, en última instancia, la forma de toda la planta.

Las paredes celulares de diferentes tejidos vegetales, como las hojas, tallos, raíces y flores, están formadas principalmente por celulosa, pero difieren en sus componentes de matriz y quizás en la organización de sus fibrillas de celulosa. Existen al menos 10 enzimas de celulosa sintasa diferentes y cada complejo enzimático de la membrana plasmática contiene dos formas diferentes, que podrían ser responsables de la distinta organización de las paredes celulares entre los diferentes tejidos.

## *Matriz extracelular*

Aunque las células animales no están rodeadas por paredes celulares, muchas de las células en los tejidos de los organismos pluricelulares se encuentran embebidas en una **matriz extracelular** constituida por proteínas secretadas y polisacáridos. La matriz extracelular rellena los espacios entre las células y une entre sí las células y los tejidos. Un tipo de matriz extracelular es la **lámina basal**, previamente denominada membrana basal, sobre la que descansan las células epiteliales (Fig. 12.52). Además de sostener láminas de células epiteliales, la lámina basal rodea a las células musculares, células adiposas, y nervios periféricos. La matriz extracelular, sin embargo, es más abundante en los tejidos conectivos. Por ejemplo, el tejido conectivo laxo bajo las capas de células epiteliales está constituido fundamentalmente por una matriz extracelular en la cual se distribuyen los fibroblastos. De igual manera, otros tipos de tejido conectivo, como el

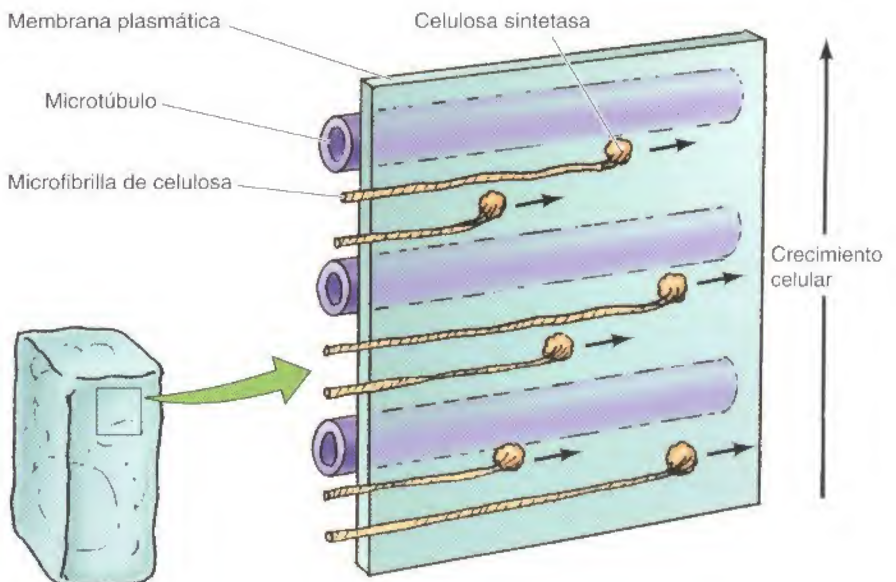



*Figura 12.51*
**Síntesis de la celulosa durante el crecimiento celular.** Las nuevas microfibrillas de celulosa, sintetizadas por un complejo enzimático de la membrana plasmática (celulosa sintetasa), se disponen en ángulo recto respecto a la dirección del crecimiento celular. La dirección de la síntesis de celulosa es paralela a los microtúbulos localizados debajo de la membrana plasmática.

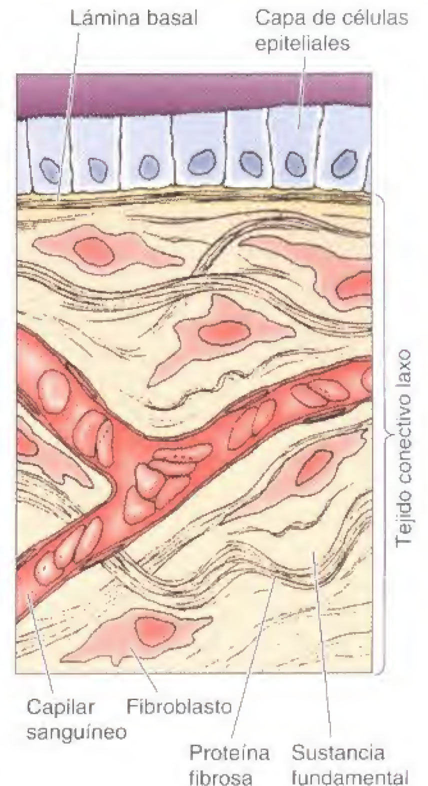



*Figura 12.52*
**Ejemplos de matriz extracelular.** Las láminas de células epiteliales descansan sobre una capa delgada de matriz extracelular llamada lámina basal. Bajo la lámina basal está el tejido conectivo laxo, que consiste fundamentalmente en matriz extracelular secretada por los fibroblastos. La matriz extracelular contiene proteínas fibrosas estructurales embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa, de naturaleza polisacarídica.

hueso, tendón, y cartílago, están constituidos fundamentalmente por matriz extracelular, que es la responsable principal de su estructura y función.

La matriz extracelular está compuesta por proteínas fibrosas, resistentes, embebidas en una sustancia fundamental gelatinosa y de naturaleza polisacarídica —un diseño similar al de la pared de las células vegetales—. Además de las proteínas estructurales fibrosas y de los polisacáridos, la matriz extracelular contiene proteínas de adhesión que unen los componentes de la matriz tanto entre sí como a las células adyacentes. Las diferencias entre los distintos tipos de matriz extracelular se deben a variaciones en el esquema general. Por ejemplo, los tendones contienen una proporción elevada de proteínas fibrosas, mientras que el cartílago contiene una alta concentración de polisacáridos que forman un gel firme, resistente a la compresión. En el hueso, la matriz extracelular está endurecida por el depósito de cristales de fosfato cálcico. La estructura laminar de la lámina basal también se debe a unos componentes de la matriz que difieren de aquellos que se encuentran en los tejidos conectivos.

La proteína estructural principal de la matriz extracelular es el **colágeno**, que es la proteína más abundante en los tejidos animales. Los colágenos son una gran familia de proteínas, constituida al menos por 19 miembros diferentes. Se caracterizan por formar hélices triples en las que tres cadenas polipeptídicas se enrollan estrechamente una alrededor de la otra en una estructura en forma de cuerda (Fig. 12.53). Los dominios de triple hélice de los colágenos consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos Gly-X-Y. Se requiere una glicina (el aminoácido más pequeño, con una cadena lateral constituida sólo por un hidrógeno) en cada tercera posición para que las cadenas polipeptídicas estén lo suficientemente agrupadas como para formar la triple hélice de colágeno. En la posición X suele aparecer la prolina, y la hidroxiprolina en la posición Y; debido a su estructura en anillo, estos aminoácidos estabilizan la conformación helicoidal de las cadenas polipeptídicas.

(A) **Triple hélice de colágeno**

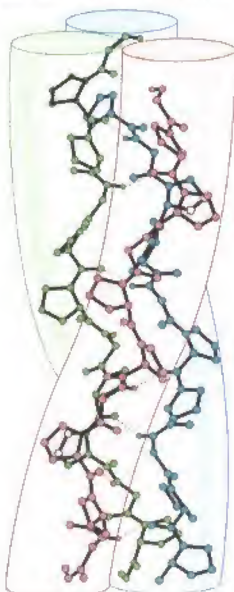
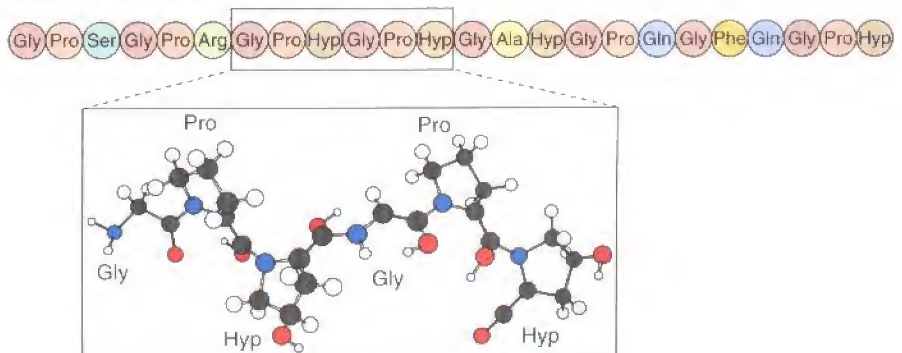


*Figura 12.53*
**Estructura del colágeno.** (A) Tres cadenas polipeptídicas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura característica de triple hélice. (B) La secuencia de aminoácidos de un dominio de triple hélice de colágeno consiste en repeticiones de Gly-X-Y, en el que X suele ser prolina e Y suele ser hidroxiprolina (Hyp).

(B) **Secuencia de aminoácidos**



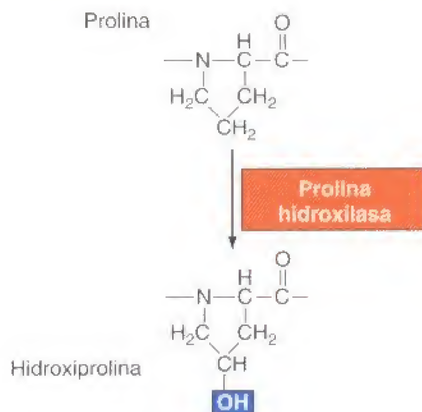



*Figura 12.54*
**Formación de la hidroxiprolina.** La prolina hidroxilasa convierte los restos de prolina del colágeno en hidroxiprolina.

**TABLA 12.2.** Miembros representativos de la familia del colágeno

| Clases de colágeno | Tipos | Distribución de tejidos |
|---|---|---|
| Formador de fibrillas (fibrilares) | I | Mayoría de tejidos conectivos |
| | II | Cartílago y humor vítreo |
| | III | Tejidos conectivos extensibles (p. ej., piel y pulmón) |
| | V | Tejidos que contienen colágeno I |
| | XI | Tejidos que contienen colágeno II |
| Asociado a fibrillas | IX | Tejidos que contienen colágeno II |
| | XII | Tejidos que contienen colágeno I |
| | XIV | Tejidos que contienen colágeno I |
| | XVI | Numerosos tejidos |
| Formador de redes | IV | Láminas basales |
| Filamentos de anclaje | VII | Zonas de unión de las láminas basales al tejido conectivo subyacente |

El aminoácido poco común hidroxiprolina se forma dentro del retículo endoplasmático a partir de la modificación de los restos de prolina que ya han sido incorporados a las cadenas polipeptídicas de colágeno (Fig. 12.54). Los restos de lisina en el colágeno suelen ser convertidos en hidroxilisinas. Se considera que los grupos hidroxilo de estos aminoácidos modificados estabilizan la triple hélice de colágeno formando enlaces de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas. Estos aminoácidos raramente se encuentran en otras proteínas, aunque la hidroxiprolina también es común en algunas de las glicoproteínas de las paredes celulares de las plantas.

E tipo de colágeno más abundante (colágeno tipo I) es uno de los colágenos fibrilares, que son los componentes estructurales fundamentales de los tejidos conectivos (Tabla 12.2). Las cadenas polipeptídicas de estos colágenos están constituidas por, aproximadamente, mil aminoácidos o 330 repeticiones de Gly-X-Y. Tras ser secretados de las células estos colágenos se ensamblan en **fibrillas de colágeno** en las que las moléculas de triple hélice se asocian en una estructura regular y discontinua (Fig. 12.55). Estas fibras no se forman dentro de la célula, porque los colágenos fibrilares se sintetizan como un precursor soluble (**procolágeno**) que contiene segmentos no helicoidales en ambos extremos de la cadena polipeptídica. El procolágeno se escinde para dar colágeno después de su secreción, de tal manera que el ensamblaje del colágeno en fibrillas sólo se produce fuera de la célula. La asociación de las moléculas de colágeno en fibrillas se refuerza debido a que se forman enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina e hidroxilisina. Frecuentemente, las fibrillas se asocian además unas con otras para formar fibras de colágeno, las cuales pueden tener varios micrómetros de diámetro.

Otros tipos de colágeno no forman fibrillas pero desempeñan distintos papeles en las diferentes clases de matrices extracelulares. Además de los colágenos fibrilares, los tejidos conectivos contienen colágenos asociados a fibrillas, que se

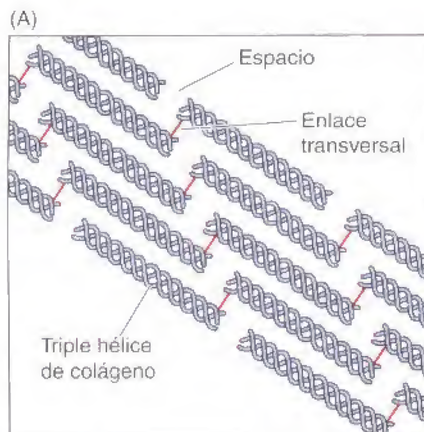
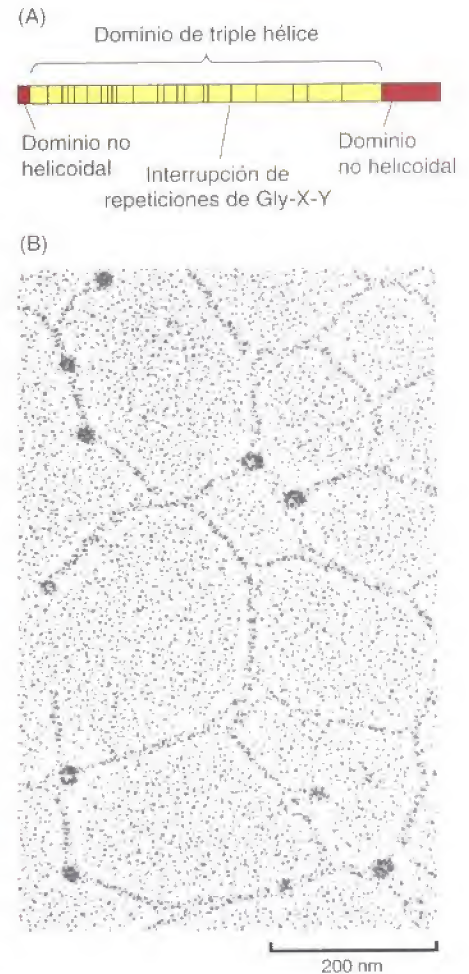






*Figura 12.55*
**Fibrillas de colágeno.** (A) Las moléculas de colágeno se ensamblan en una formación discontinua regular para constituir fibrillas. Las moléculas se superponen en una cuarta parte de su longitud, y hay un pequeño hueco entre el extremo N-terminal de una molécula y el extremo C-terminal de la siguiente. Esta estructura queda reforzada mediante enlaces covalentes transversales entre las cadenas laterales de los restos de lisina o de hidroxilisina, principalmente en los extremos de las moléculas. (B) Micrografía electrónica de fibrillas de colágeno. La disposición discontinua de las moléculas de colágeno y los huecos entre ellas son la causa de las estriaciones transversales características de las fibrillas. (B, J. Gross, F.O. Sahmitt y D. Fawcett/Visuals Unlimited.)

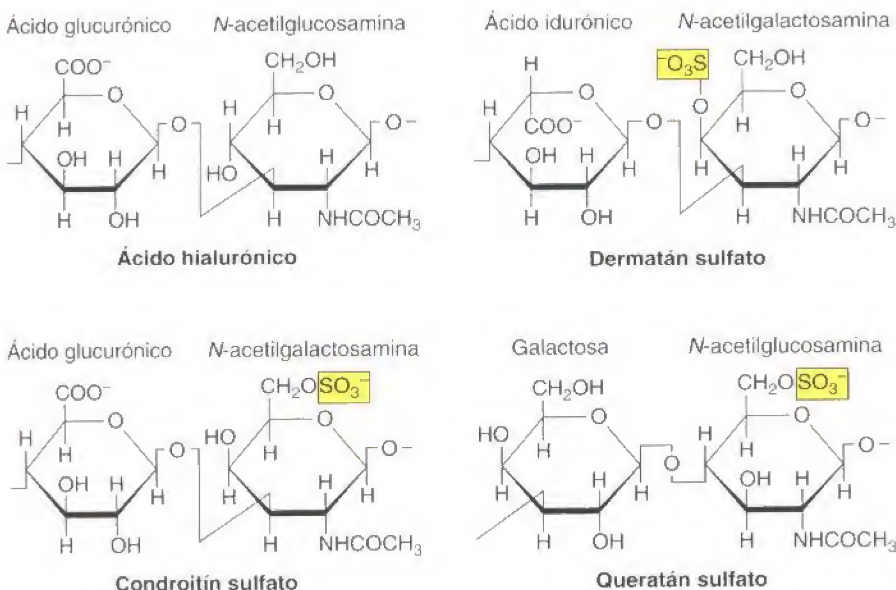
*Figura 12.56*
**Colágeno tipo IV.** (A) La estructura repetida de Gly-X-Y del colágeno tipo IV (amarillo) está interrumpida por múltiples secuencias no helicoidales (barras). (B) Micrografía electrónica de una red de colágeno tipo IV. (B, P. D. Yurchenco y J. C. Schittny, 1990. FASEB J. 4:1577.)




unen a la superficie de las fibrillas del colágeno y las conectan entre sí y a otros componentes de la matriz. Las láminas basales están constituidas por un tipo de colágeno distinto (colágeno tipo IV), que es un colágeno formador de redes (Fig. 12.56). Las repeticiones de Gly-X-Y de estos colágenos se interrumpen frecuentemente por pequeñas secuencias no helicoidales. Debido a estas interrupciones, los colágenos formadores de redes son más flexibles que los colágenos formadores de fibrillas. Como consecuencia, se ensamblan en redes entrelazadas bidimensionales en lugar de en fibrillas. Otro tipo de colágeno forma fibrillas de anclaje que anclan a algunas láminas basales con el tejido conectivo subyacente.

Los tejidos conectivos también contienen **fibras elásticas**, que son particularmente abundantes en aquellos órganos que, regularmente, se extienden y después retornan a su forma original. Los pulmones, por ejemplo, se extienden con cada inspiración y retornan a su forma original con cada exhalación. Las fibras elásticas se componen principalmente de una proteína denominada **elastina** que forma una red, con puentes cruzados mediante enlaces covalentes entre las cadenas laterales de restos de lisina (similares a los del colágeno). Esta red de cadenas de elastina entrelazadas se comporta como una goma elástica, estirándose con la tensión y retornando de golpe a su forma inicial cuando dicha tensión se libera.

Las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas en un gel formado a partir de unos polisacáridos denominados **glicosaminoglicanos**, o **GAGs**, que están constituidos por unidades repetidas de disacáridos (Fig. 12.57). Uno de los azúcares del disacárido puede ser *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina y el segundo suele ser un ácido (bien ácido glucurónico o ácido idurónico). Con la excepción del ácido hialurónico, estos azúcares se modifican por la adición de grupos sulfato. Por lo tanto, los GAGs tienen una carga negativa elevada. Al igual que las pectinas de las paredes celulares vegetales, se unen a iones cargados positivamente y atrapan moléculas de agua para formar geles hidratados, proporcionando así un soporte mecánico a la matriz extracelular.



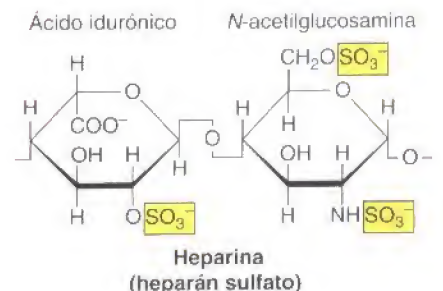




*Figura 12.57*
**Tipos principales de glicosaminoglicanos.** Los glicosaminoglicanos están constituidos por la repetición de unidades de disacáridos. Con la excepción del ácido hialurónico, los azúcares suelen contener sulfato. El heparán sulfato es similar a la heparina pero contiene menos grupos sulfato.

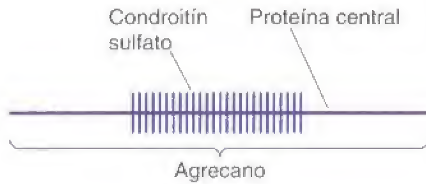
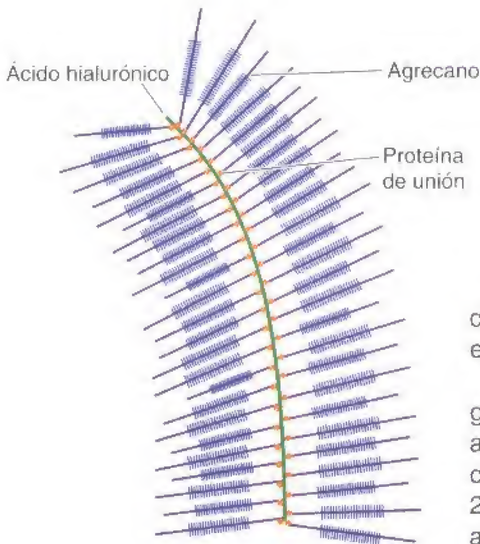



*Figura 12.58*
**Complejos de agrecano y ácido hialurónico.** El agrecano es un gran proteoglicano constituido por más de 100 cadenas de condroitín sulfato unidas a una proteína central. Múltiples moléculas de agrecano se unen a largas cadenas de ácido hialurónico, formando grandes complejos en la matriz extracelular del cartílago. Esta asociación se estabiliza por proteínas de unión.




El ácido hialurónico es el único GAG que aparece como una única cadena larga de polisacárido. Todos los demás GAGs se unen a proteínas para formar **proteoglicanos**, que están constituidos hasta por un 95 % de polisacáridos en peso. Los proteoglicanos pueden contener desde solamente una o hasta más de cien cadenas de GAG unidas a restos de serina de una proteína central. Se han identificado varias proteínas centrales (que abarcan desde 10 a >500 kDa), por lo que los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas. Además de ser componentes de la matriz extracelular, algunos proteoglicanos son proteínas de la superficie celular que intervienen en la adhesión celular. Algunos de estos proteoglicanos, los sindícanos, poseen dominios transmembrana y participan junto con las integrinas en la señalización a través de complejos de adhesión.

Algunos proteoglicanos interaccionan con el ácido hialurónico para formar grandes complejos en la matriz extracelular. Un ejemplo bien conocido es el agrecano, el principal proteoglicano del cartílago (Fig. 12.58). Más de cien cadenas de condroitín sulfato se unen a una proteína central de aproximadamente 250 kDa, formando un proteoglicano de casi 3.000 kDa. Múltiples moléculas de agrecano se asocian con cadenas de ácido hialurónico, constituyendo grandes agregados (>100.000 kDa) que quedan atrapados en la red de colágeno. Los proteoglicanos también interaccionan con el colágeno y con otras proteínas de la matriz para formar redes gelatinosas en las que las proteínas estructurales fibrosas de la matriz extracelular están embebidas. Por ejemplo, el perlecano (el principal proteoglicano heparán sulfato de la lámina basal) se une tanto al colágeno tipo IV como a la proteína de adhesión laminina, que se describirá posteriormente.

Las proteínas de adhesión, el tercer tipo de los constituyentes de la matriz extracelular, son las responsables de unir los componentes de la matriz entre sí y a la superficie de las células. El prototipo de estas moléculas es la **fibronectina**, que es la principal proteína de adhesión de los tejidos conectivos. La fibronectina es una glicoproteína dimérica constituida por dos cadenas polipeptídicas, conteniendo cada una cerca de 2.500 aminoácidos (Fig. 12.59). Además la fibronectina se dispone en la matriz extracelular a modo de una red de fibrillas, mediante puentes disulfuro. La fibronectina tiene sitios de unión para el colágeno y para los GAGs, por lo que actúa como un puente de unión entre estos componentes de la matriz. Un sitio distinto de la molécula de fibronectina es reconocido por receptores de superficie celular, y de esta manera es responsable de la unión de las células a la matriz extracelular.

La lámina basal contiene una proteína de adhesión distinta denominada **laminina** (Fig. 12.60). Al igual que el colágeno tipo IV, las lamininas pueden autoensamblarse en polímeros con forma de red. Estas redes de laminina son los principales componentes estructurales de las láminas basales sintetizadas en los embriones muy tempranos, que no contienen colágeno. Las lamininas también tienen sitios de unión para receptores de superficie celular, para colágeno de tipo IV, y para perlecano. Además, las lamininas están íntimamente

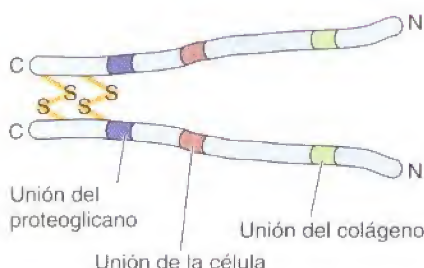



*Figura 12.59*
**Estructura de la fibronectina.** La fibronectina es un dímero de cadenas polipeptídicas similares unidas por puentes disulfuro cerca del extremo C-terminal. Se indican los sitios de unión para proteoglicanos, células y colágeno. La molécula también contiene sitios adicionales de unión que no se muestran.

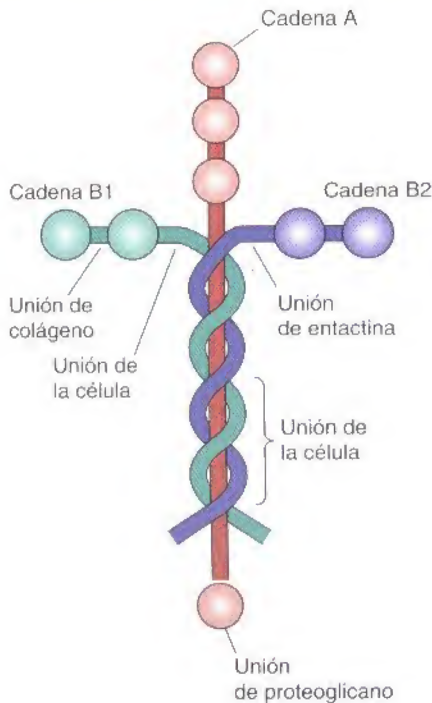



*Figura 12.60*
**Estructura de la laminina.** La laminina está constituida por tres cadenas polipeptídicas designadas como A, B1 y B2. Se indican algunos de los sitios de unión para la entactina, el colágeno tipo IV, los proteoglicanos y los receptores de superficie celular.

asociadas con otra proteína de adhesión, denominada **entactina** o **nidógeno**, que también se une al colágeno tipo IV. Como resultado de estas múltiples interacciones, la laminina, la entactina, el colágeno tipo IV y el perlecano forman redes entrecruzadas en la lámina basal.

Los principales receptores celulares de superficie responsables de la unión de las células a la matriz extracelular son las **integrinas**. Las integrinas son una familia de proteínas transmembrana constituidas por dos subunidades, designadas $\alpha$ y $\beta$ (Fig. 12.61). Se han identificado más de 20 integrinas diferentes, formadas por la combinación de 18 subunidades $\alpha$ y 8 subunidades $\beta$ conocidas. Las integrinas se unen a secuencias cortas de aminoácidos presentes en múltiples componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, fibronectina, y laminina. El primero de tales sitios de unión a las integrinas en ser caracterizado fue la secuencia Arg-Gly-Asp, que es reconocida por varios miembros de la familia de las integrinas. Otras integrinas, sin embargo, se unen a secuencias peptídicas diferentes, incluyendo las secuencias de reconocimiento de los colágenos y las lamininas. Los proteoglicanos transmembrana de la superficie de varias células también se unen a los componentes de la matriz extracelular y modulan las interacciones célula-matriz.

Además de fijar las células a la matriz extracelular, las integrinas sirven como anclaje para el citoesqueleto (Fig. 12.62). La unión del citoesqueleto a la matriz extracelular es la responsable de la estabilidad de las uniones célula-matriz. Distintos tipos de interacciones entre las integrinas y el citoesqueleto se encuentran en dos tipos de contactos célula-matriz, las **adhesiones focales** y los **hemidesmosomas**, que se describieron en el Capítulo 11. Las adhesiones focales anclan varios tipos celulares, incluyendo a los fibroblastos, a la matriz extracelular. Los dominios citoplásmicos de las subunidades $\beta$ de las integrinas en estas uniones célula-matriz anclan el citoesqueleto de actina uniéndose a los haces de filamentos de actina. Los hemidesmosomas son sitios de unión espe-

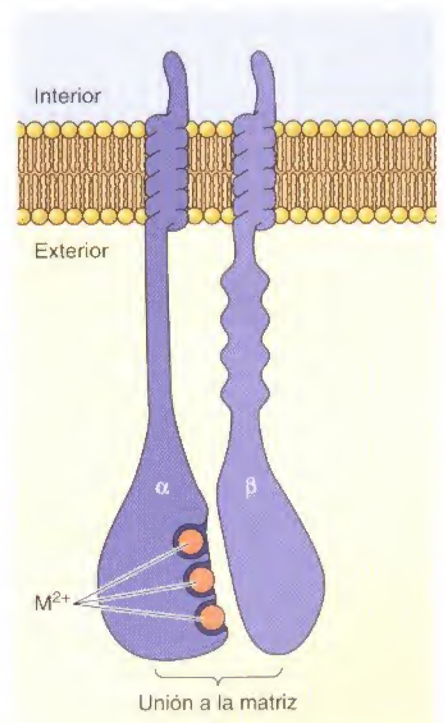



*Figura 12.61*
**Estructura de las integrinas.** Las integrinas son heterodímeros de dos subunidades transmembrana, designadas $\alpha$ y $\beta$. La subunidad $\alpha$ fija cationes divalentes ($M^{2+}$). La zona de unión a la matriz se compone de porciones de ambas subunidades.

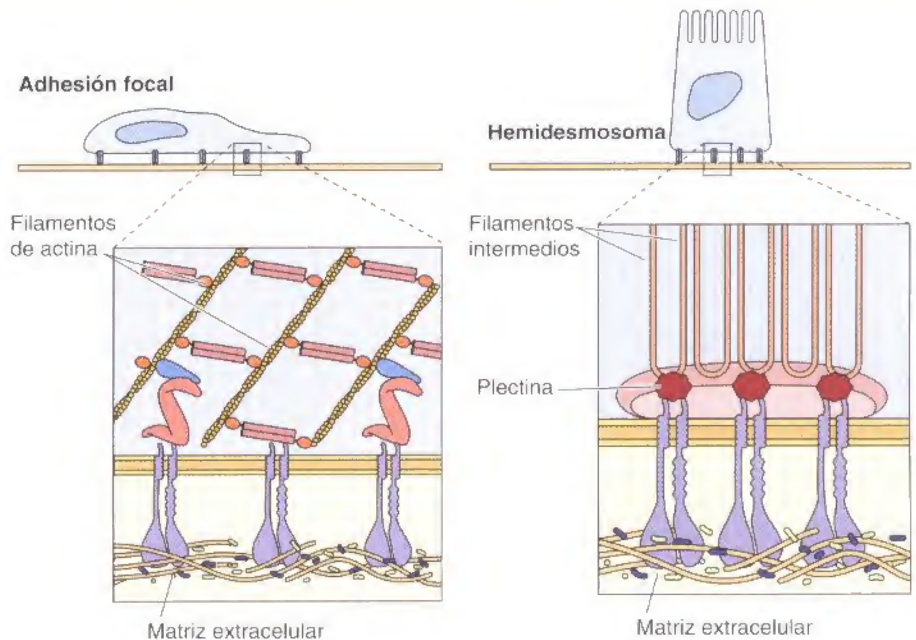



*Figura 12.62*
**Uniones entre las células y la matriz extracelular.** Las integrinas median dos tipos de uniones estables en las que el citoesqueleto se fija a la matriz extracelular. En las adhesiones focales, los haces de filamentos de actina se anclan a las subunidades $\beta$ de la mayoría de las integrinas mediante asociaciones con otras proteínas, incluyendo $\alpha$-actinina, talina y vinculina (véase Fig. 11.14). En los hemidesmosomas, la integrina $\alpha_6\beta_4$ une la lámina basal a los filamentos intermedios a través de la plectina.

cializados de las células epiteliales en los que una integrina específica (designada como $\alpha_6\beta_4$) interacciona con los filamentos intermedios en lugar de con la actina. La integrina $\alpha_6\beta_4$ se une a la laminina, por lo que los hemidesmosomas anclan las células epiteliales a la lámina basal.

## Interacciones célula-célula

Las interacciones directas entre las células, al igual que entre las células y la matriz extracelular, son críticas para el desarrollo y para la función de los organismos pluricelulares. Algunas interacciones célula-célula son transitorias, como las interacciones entre las células del sistema inmunitario y las interacciones que dirigen a los glóbulos blancos sanguíneos a los lugares de inflamación tisular. En otros casos, las uniones estables célula-célula desempeñan un papel clave en la organización de las células en los tejidos. Por ejemplo, varios tipos diferentes de uniones estables célula-célula son críticas para el mantenimiento y la función de las láminas de células epiteliales. Las células vegetales también se asocian con las células vecinas no sólo mediante interacciones entre sus paredes celulares, sino también mediante uniones especializadas entre sus membranas plasmáticas.

### *Proteínas de adhesión celular*

La adhesión célula-célula es un proceso selectivo, de tal forma que las células se adhieren solamente a otros tipos específicos de células. Esta selectividad se demostró por primera vez en estudios clásicos de desarrollo embrionario, que mostraban que las células de un tejido (p. ej., el hígado) se adhieren específicamente a células del mismo tejido antes que a células de un tejido diferente (p. ej., cerebro). Esta adhesión célula-célula selectiva viene mediada por proteínas transmembrana denominadas **moléculas de adhesión celular**, que pueden dividirse en cuatro grupos principales: las **selectinas**, las **integrinas**, la **superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)** (llamadas así debido a que contienen dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas), y las **cadherinas** (Tabla 12.3). La adhesión celular mediada por selectinas, integrinas, y cadherinas requiere $Ca^{2+}$ o $Mg^{2+}$, por lo que muchas interacciones adhesivas entre las células son $Ca^{2+}$ —o $Mg^{2+}$— dependientes.

**TABLA 12.3.** Moléculas de adhesión celular

| Familia | Ligandos reconocidos | Uniones celulares estables |
|---|---|---|
| Selectinas | Carbohidratos | No |
| Integrinas | Matriz extracelular | Adhesiones focales y hemidesmosomas |
| | Miembros de la superfamilia de Ig | No |
| Superfamilia de Ig | Integrinas | No |
| | Interacciones homofílicas | No |
| Cadherinas | Interacciones homofílicas | Uniones adherentes y desmosomas |

Las selectinas median interacciones transitorias entre los leucocitos y las células endoteliales o las plaquetas sanguíneas. Existen tres miembros de la familia de las selectinas: L-selectina, que se expresa en los leucocitos; E-selectina, que se expresa en las células endoteliales; y P-selectina, que se expresa en las plaquetas. Como se describió anteriormente en este capítulo, las selectinas reconocen a los carbohidratos de la superficie celular (véase Fig. 12.14). Uno de sus papeles clave es iniciar las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales durante la migración de los leucocitos desde la circulación a los lugares de inflamación tisular (Fig. 12.63). Las selectinas median la adhesión inicial de los leucocitos a las células endoteliales. Tras esto se forman adhesiones más estables, en las que las integrinas de la superficie de los leucocitos se unen a moléculas de adhesión intracelular (ICAMs), que son miembros de la superfamilia de las Ig que se expresan en la superficie de las células endoteliales. Los leucocitos firmemente sujetos son capaces entonces de penetrar la pared de los capilares y entrar al tejido circundante, migrando entre las células endoteliales.

La unión de las ICAMs a las integrinas es un ejemplo de **interacción heterofílica**, en que una molécula de adhesión de la superficie de una célula (p. ej., una ICAM) reconoce una molécula diferente de la superficie de otra célula (p. ej., una integrina). Otros miembros de la superfamilia de las Ig median **interacciones homofílicas**, en las que una molécula de adhesión de la superficie de una célula se une a la misma molécula de la superficie de otra célula. Esta unión homofílica conduce a una adhesión selectiva entre células del mismo tipo. Por ejemplo, las moléculas de adhesión de células nerviosas (*N*-CAMs) son miembros de la superfamilia de las Ig que se expresan en las células nerviosas, y la unión homofílica entre *N*-CAMs contribuye a formar asociaciones selectivas

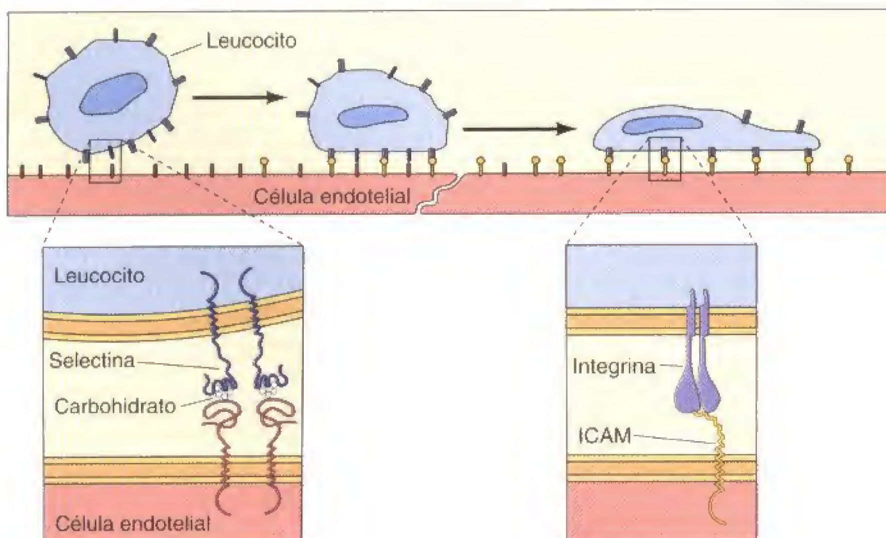



*Figura 12.63*
**Adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales.** Los leucocitos abandonan la circulación en los lugares de inflamación tisular interaccionando con las células endoteliales de las paredes de los capilares. El primer paso en esta interacción es la unión de las selectinas leucocitarias a los ligandos de carbohidrato de la superficie de la célula endotelial. A este paso le siguen interacciones más estables entre las integrinas leucocitarias y miembros de la superfamilia de las Ig (ICAMs) de las células endoteliales.

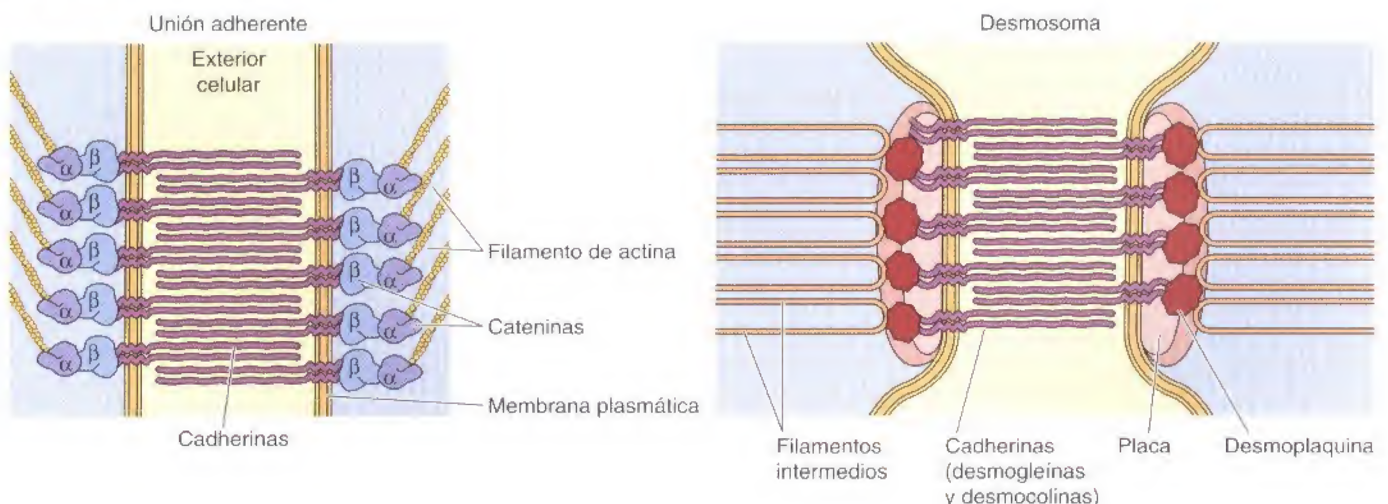
entre las células nerviosas durante el desarrollo. Existen más de cien miembros de la superfamilia de las Ig, los cuales median diversas interacciones célula-célula.

El cuarto grupo de moléculas de adhesión celular, las cadherinas, también muestran especificidad de unión homofílica. No sólo están implicadas en la adhesión selectiva entre las células embrionarias sino que también son los principales responsables de la formación de uniones estables entre las células en los tejidos. Las cadherinas son una familia grande de proteínas (unos 80 miembros) que comparten un dominio extracelular común implicado en interacciones hemofílicas. Existen varias subfamilias de cadherinas (cadherinas clásicas, cadherinas semejantes a grasas, cadherinas de siete dominios transmembrana) y difieren tanto en su dominio transmembrana como en su dominio citosólico.

Las cadherinas clásicas contienen un solo dominio transmembrana y están ancladas al citoesqueleto mediante la interacción de su dominio citosólico con la $\beta$-catenina o la desmoplaquina (Figura 12.64). Otra porción del dominio citosólico se une a factores de intercambio de GTP que regulan a las proteínas de bajo peso molecular de la familia Rho, las cuales controlan la formación y estabilidad de los contactos célula a célula. Por ejemplo, la cadherina-E es expresada en células epiteliales, de modo que interacciones hemofílicas entre cadherinas-E desencadenan la adhesión selectiva entre células epiteliales. Es importante saber que la pérdida de la cadherina-E puede desencadenar el desarrollo de cánceres que surgen de células epiteliales, lo que ilustra la importancia de las interacciones célula-célula para controlar el comportamiento celular. Distintos miembros de la familia de las cadherinas, como la cadherina-N (cadherina neural) y la cadherina-P (cadherina placentaria), median la adhesión selectiva de otros tipos celulares.

A diferencia de las uniones estables célula-matriz descritas en la sección anterior, las interacciones célula-célula mediadas por las selectinas, integrinas, y miembros de la superfamilia de las Ig son adhesiones transitorias en las que los citoesqueletos de las células adyacentes no se unen entre sí. En cambio, las uniones de adhesión estable que implican a los citoesqueletos de las células adyacentes son mediadas por las cadherinas. Como se trató en el Capítulo 11, estas uniones célula-célula son de dos tipos: **uniones adherentes** y **desmosomas**, en las que las cadherinas o proteínas relacionadas (desmogleínas y desmocolinas) se unen, respectivamente, a los haces de actina y a los filamentos intermedios (Fig. 12.64). Por lo tanto, el papel de las cadherinas al unir el citoesqueleto de las células adyacentes es análogo al de las integrinas al formar uniones estables entre las células y la matriz extracelular.

*Figura 12.64*
**Uniones estables célula-célula mediadas por las cadherinas.** Las interacciones homofílicas entre las cadherinas median dos tipos de adhesiones estables célula-célula. En las uniones adherentes, las cadherinas se unen a haces de filamentos de actina a través de las cateninas (véase Fig. 11.14). En los desmosomas, la desmoplaquina une miembros de la superfamilia de las cadherinas (desmogleínas y desmocolinas) a los filamentos intermedios (véase Fig. 11.34).



### *Uniones estrechas*

Además de las uniones de adhesión mediadas por las cadherinas, otros dos tipos de uniones célula-célula especializadas desempeñan papeles clave en los tejidos animales. Las **uniones estrechas**, que generalmente suelen aparecer asociadas a las uniones adherentes y a los desmosomas en un **complejo de unión** (Fig. 12.65), tienen una importancia crítica para la función de las capas de células epiteliales como barreras entre compartimentos fluidos. Por ejemplo, el epitelio intestinal separa la luz del intestino del tejido conectivo subyacente, que contiene capilares sanguíneos. Las uniones estrechas desempeñan dos papeles que permiten al epitelio efectuar dichas funciones de barrera. En primer lugar, las uniones estrechas constituyen un precinto que previene el libre tránsito de las moléculas (incluyendo iones) entre las células de las láminas epiteliales. En segundo lugar, las uniones estrechas separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática al impedir la libre difusión de los lípidos y de las proteínas de membrana entre ambos dominios. Como consecuencia, los sistemas especializados de transporte en los dominios apical y basolateral son capaces de controlar el tráfico de moléculas entre los distintos compartimentos extracelulares, como el transporte de glucosa entre la luz intestinal y el torrente sanguíneo (véase Fig. 12.32).

Las uniones estrechas son los contactos más íntimos conocidos entre células adyacentes. Se describieron originalmente como puntos de fusión aparente entre las capas externas de las membranas plasmáticas, aunque ahora está claro que las membranas no se fusionan. En su lugar, las uniones estrechas parece que están constituidas por una red de hebras proteínicas que se continúan alrededor de todo el perímetro de la célula (véase Fig. 12.65). Se cree que cada hebra de estas redes está compuesta por proteínas transmembrana (claudinas y ocludinas) que se unen a proteínas similares en las células adyacentes, sellando de esta forma el espacio entre sus membranas plasmáticas.

### *Uniones de tipo* gap

Las **uniones de tipo *gap***, que se encuentran en la mayoría de los tejidos animales, actúan como una conexión directa entre los citoplasmas de las células adyacentes. Proporcionan canales abiertos a través de la membrana plasmática, lo

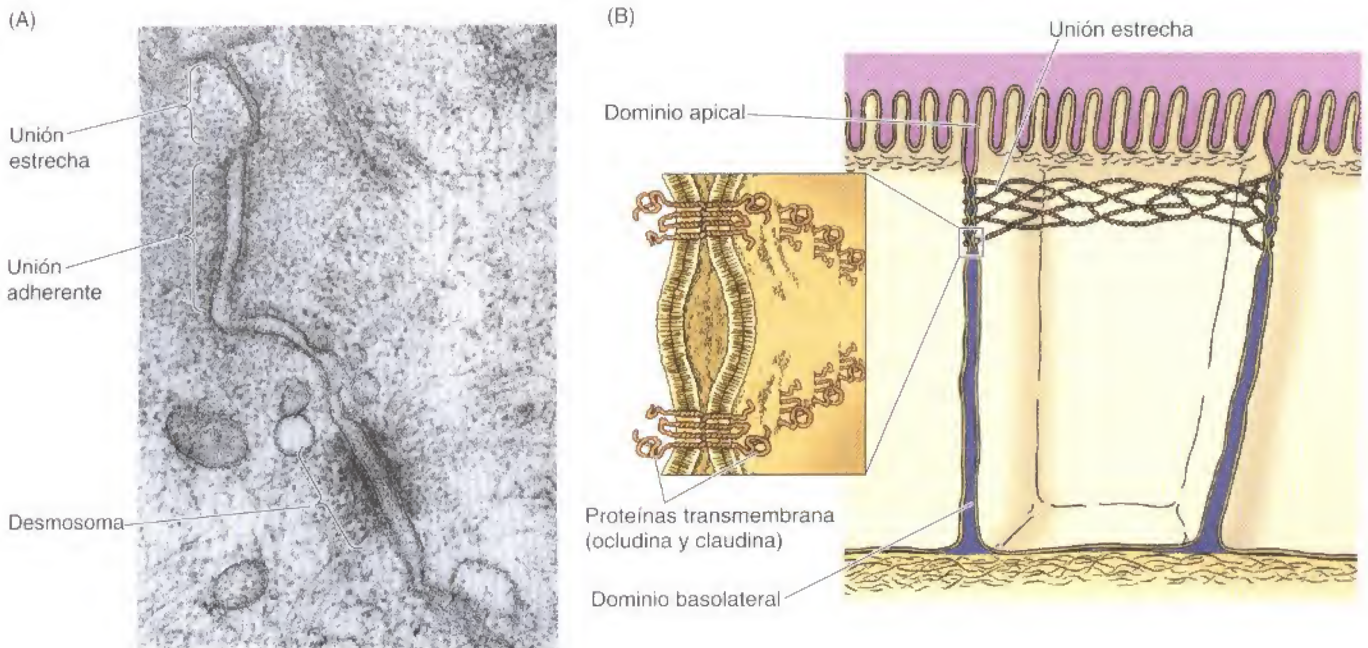



*Figura 12.65*
**Uniones estrechas.** (A) Micrografía electrónica de células epiteliales unidas por un complejo de unión, que incluye una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma. (B) Las uniones estrechas se forman por interacciones entre hebras de proteínas transmembrana (ocludina y claudina) de las células adyacentes. (A, Don Fawcett/ Photo Researchers, Inc.)

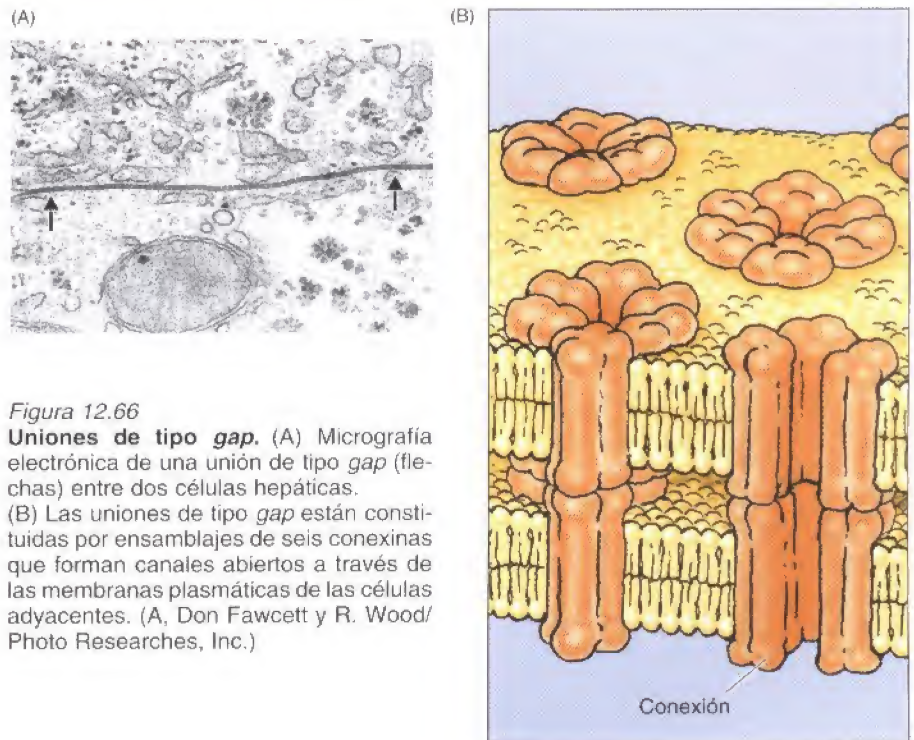


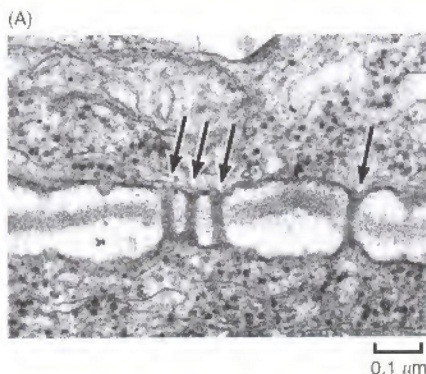

*Figura 12.66*
**Uniones de tipo *gap*.** (A) Micrografía electrónica de una unión de tipo *gap* (flechas) entre dos células hepáticas.
(B) Las uniones de tipo *gap* están constituidas por ensamblajes de seis conexinas que forman canales abiertos a través de las membranas plasmáticas de las células adyacentes. (A, Don Fawcett y R. Wood/ Photo Researches, Inc.)

que permite a los iones y a las moléculas pequeñas (menores de, aproximadamente, mil daltons) difundirse libremente entre las células vecinas, pero impide el paso de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Como consecuencia, las uniones de tipo *gap* acoplan tanto la actividad metabólica como las respuestas eléctricas de las células que conectan. La mayoría de las células en los tejidos animales —incluyendo las células epiteliales, las células endoteliales, y las células del músculo cardíaco y liso— se comunican por uniones de tipo *gap*. En las células eléctricamente excitables, como las células del músculo cardiaco, el tránsito directo de iones a través de las uniones de tipo *gap* acopla y sincroniza las contracciones de las células vecinas. Las uniones de tipo *gap* también permiten el tránsito entre células adyacentes de algunas moléculas señal intracelulares, como el AMPc y el $Ca^{2+}$, coordinándose así las respuestas de las células en los tejidos.

Las uniones de tipo *gap* son estructuras constituidas por proteínas transmembrana denominadas **conexinas** (Fig. 12.66). Seis conexinas se ensamblan para formar un cilindro con un poro acuoso abierto en su centro. A continuación, esta estructura de conexinas en la membrana plasmática de una célula se alinea con las conexinas de una célula adyacente, formando un canal abierto entre los dos citoplasmas. Las membranas plasmáticas de las dos células quedan separadas por un intervalo que corresponde al espacio ocupado por los dominios extracelulares de las conexinas —de ahí el término «unión de tipo *gap*» que fue acuñado por los electromicroscopistas. Muchas células expresan más de un miembro de la familia de las conexinas, y las combinaciones de diferentes proteínas conexinas puede dar lugar a uniones de tipo *gap* de diversas propiedades.

## *Adhesión de las células vegetales y plasmodesmos*

La adhesión entre las células vegetales tiene lugar a través de sus paredes celulares en vez de mediante proteínas transmembrana. En particular, una región especializada rica en pectina de la pared celular llamada la **lámina media** actúa como un pegamento que mantiene unidas las células adyacentes. Debido



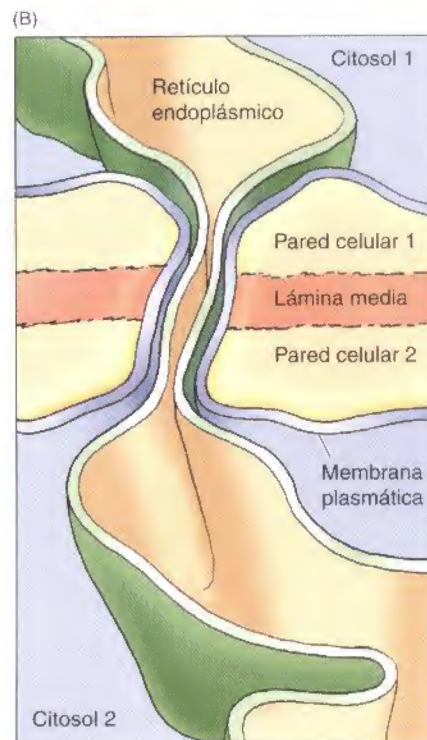




*Figura 12.67*
**Plasmodesmos.** (A) Micrografía electrónica de plasmodesmos (flechas). (B) En los plasmodesmos las membranas plasmáticas de las células vecinas son continuas, formando canales citoplasmáticos a través de las paredes celulares adyacentes. Una extensión del retículo endoplásmico suele atravesar el canal. (A, E. H. Newcomb, University of Wisconsin/Biological Photo Service.)

a la rigidez de las paredes celulares vegetales, las asociaciones estables entre las células vegetales no requieren la formación de puentes citoesqueléticos, como aquellos proporcionados por los desmosomas y las uniones adherentes de las células animales. Sin embargo, las células vegetales adyacentes se comunican entre sí mediante conexiones citoplasmáticas llamadas **plasmodesmos**, que actúan de forma análoga a las uniones de tipo *gap* de la célula animal.

A pesar de sus similitudes en la función, los plasmodesmos no están relacionados estructuralmente con las uniones de tipo *gap*. En cada plasmodesmo la membrana plasmática de una célula es continua con la de su vecina, creando un canal abierto entre los dos citosoles (Fig. 12.67). Una extensión del retículo endoplasmático liso pasa a través del poro, dejando un anillo de citoplasma circundante a través del cual los iones y las moléculas pequeñas son capaces de pasar libremente entre las células. Además, los plasmodesmos pueden expandirse en respuesta a un estímulo apropiado, permitiendo el tránsito regulado de macromoléculas entre las células adyacentes. De esta manera, los plasmodesmos desempeñan un papel clave en el desarrollo vegetal mediante el control del tráfico de moléculas reguladoras, como son los factores de transcripción o los ARNs, entre las células.

## RESUMEN

### ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

***Bicapa fosfolipídica:*** La estructura fundamental de la membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica, que también contiene glicolípidos y colesterol.

***Proteínas de membrana:*** Las proteínas asociadas a la membrana son las responsables de llevar a cabo las funciones específicas de la membrana. La membrana se caracteriza como un mosaico fluido en el que las proteínas se insertan en la bicapa fosfolipídica.

## PALABRAS CLAVE

**fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidilinositol, glicolípidos, colesterol**

**modelo de mosaico fluido, proteínas periféricas de membrana, proteínas integrales de membrana, proteínas transmembrana, porinas, puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI)**

**dominio apical, dominio basolateral, balsa lipídica**

***Movilidad de las proteínas de membrana:*** Las proteínas son libres de difundirse lateralmente a través de la bicapa fosfolipídica. Sin embargo, la movilidad de algunas proteínas se restringe por sus asociaciones con otras moléculas. Además, las uniones estrechas impiden que las proteínas se muevan entre los distintos dominios de la membrana plasmática de las células epiteliales.

**glicocálix, selectina**

***Glicocálix:*** La superficie celular está recubierta por una capa de carbohidratos denominada el glicocálix. Los carbohidratos de la superficie celular sirven de marcadores para el reconocimiento intercelular.

## TRANSPORTE DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

**difusión pasiva**

***Difusión pasiva:*** Las moléculas hidrofóbicas pequeñas son capaces de cruzar la membrana plasmática difundiendo a través de la bicapa fosfolipídica.

**difusión facilitada, proteína transportadora, proteína de canal**

***Difusión facilitada y proteínas transportadoras:*** El tránsito de la mayoría de las moléculas biológicas viene mediado por proteínas transportadoras o de canal que permiten a las moléculas polares y cargadas atravesar la membrana plasmática sin interaccionar con su interior hidrofóbico.

**canal iónico, canal regulado por ligando, canal regulado por voltaje, técnica de *patch-clamp*, ecuación de Nernst, potencial de acción**

***Canales iónicos:*** Los canales iónicos median el tránsito rápido de iones seleccionados a través de la membrana plasmática. Están especialmente bien caracterizados en las células nerviosas y musculares, donde son los responsables de la transmisión de señales eléctricas.

**transporte activo, bomba iónica, bomba de $Na^+$ – $K^+$, ATPasa $Na^+$ – $K^+$, transportador ABC**

***Transporte activo dirigido por hidrólisis de ATP:*** La energía derivada de la hidrólisis del ATP puede dirigir el transporte de moléculas en contra de su gradiente electroquímico.

**simporte, uniporte, antiporte**

***Transporte activo dirigido por gradientes iónicos:*** Los gradientes iónicos se emplean frecuentemente como una fuente de energía para conducir el transporte activo de otras moléculas.

## ENDOCITOSIS

**endocitosis, fagocitosis, pinocitosis, fagosoma, fagolisosoma**

***Fagocitosis:*** Las células ingieren partículas grandes, como bacterias y desechos celulares, por fagocitosis.

**endocitosis mediada por receptor, depresión revestida de clatrina, vesícula revestida de clatrina, ligando, lipoproteína de baja densidad (LDL), endocitosis en fase fluida, caveolas, macropinocitosis**

***Endocitosis mediada por receptor:*** La forma mejor conocida de endocitosis es la endocitosis mediada por receptor, que proporciona un mecanismo para la entrada selectiva de macromoléculas específicas.

**endosoma, regulación a partir de los receptores, transcitosis**

***Tráfico de proteínas en la endocitosis:*** Las moléculas recogidas por endocitosis son transportadas a los endosomas, donde se clasifican para ser recicladas a la membrana plasmática o para ser degradadas en los lisosomas.

## PAREDES CELULARES Y MATRIZ EXTRACELULAR

**peptidoglicano**

***Paredes celulares bacterianas:*** El principal componente de las paredes celulares bacterianas es un peptidoglicano constituido por cadenas de polisacáridos unidas transversalmente mediante péptidos cortos.

**quitina, celulosa, microfibrilla de celulosa, hemicelulosa, pectina, pared celular primaria, pared celular secundaria, lignina, presión de turgencia, auxina, celulosa sintetasa**

***Paredes celulares vegetales:*** Las paredes celulares de los hongos, algas, y plantas superiores se componen de polisacáridos fibrosos (p. ej., celulosa) embebidos en una matriz gelatinosa de polisacáridos y proteínas. Sus paredes celulares rígidas permiten a las células vegetales expandirse rápidamente por la entrada de agua.

***Matriz extracelular:*** Las células animales en los tejidos se rodean de una matriz extracelular constituida por proteínas secretadas y polisacáridos. Los receptores de la superficie celular se unen a la matriz extracelular y anclan el citoesqueleto en las uniones célula-matriz.

**matriz extracelular, lámina basal, colágeno, fibrilla de colágeno, procolágeno, fibra elástica, elastina, glicosaminoglicano (GAG), proteoglicano, fibronectina, laminina, entactina, nidógeno, integrina, adhesión focal, hemidesmosoma**

### INTERACCIONES CÉLULA-CÉLULA

***Proteínas de adhesión celular:*** Las interacciones selectivas intercelulares están mediadas por cuatro grupos principales de proteínas de adhesión celular: selectinas, integrinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y cadherinas. Las cadherinas unen los citoesqueletos de las células adyacentes en las uniones célula–célula estables.

**molécula de adhesión celular, selectina, integrina, superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), cadherina, interacción heterofílica, interacción homofílica, uniones adherentes, desmosoma**

***Uniones estrechas:*** Las uniones estrechas impiden el libre tránsito de las moléculas entre las células epiteliales, y separan los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

**unión estrecha, complejo de unión**

***Uniones de tipo gap:*** Las uniones de tipo *gap* son canales abiertos que conectan los citoplasmas de las células adyacentes.

**unión de tipo *gap*, conexina**

***Adhesión de las células vegetales y plasmodesmos:*** Las células vegetales adyacentes se unen a través de conexiones citoplasmáticas denominadas plasmodesmos.

**lámina media, plasmodesmo**

## Preguntas

**1.** Explica cómo el colesterol puede extender el rango de temperatura en el que puede funcionar una bicapa de membrana.

**2.** ¿Cómo puede distinguirse experimentalmente entre proteínas periféricas de membrana y las proteínas integrales de membrana?

**3.** ¿Cuáles serían las consecuencias de incorporar las porinas a la membrana plasmática en lugar de a la membrana externa de las bacterias?

**4.** ¿Cómo apoyaron los experimentos de fusión celular de Frye y Edidin el modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana? ¿Qué resultados hubieran obtenido si hubiesen incubado células fusionadas a 2 °C?

**5.** ¿Cuáles son dos de las principales funciones del glicocálix?

**6.** La concentración de $K^+$ es casi 20 veces superior en el interior de los axones de calamar que en los fluidos extracelulares, generando un potencial de equilibrio de membrana de –75 mV. ¿Cuál sería el potencial de equilibrio de membrana esperado si la concentración de $K^+$ fuera solamente 10 veces mayor dentro que fuera de la célula? ¿Por qué el potencial de reposo habitual de la membrana (–60 mV) es diferente del potencial de equilibrio del $K^+$, de –75 mV?

**7.** Una función importante de la bomba de $Na^+ - K^+$ en las células animales es mantener el equilibrio osmótico. ¿Por qué esto no es necesario en las células vegetales?

**8.** ¿Qué información hemos obtenido a partir de estudios sobre células de niños con hipercolesterolemia familiar sobre los mecanismos de endocitosis mediada por receptores?

**9.** ¿En qué difieren las paredes celulares y membranas adyacentes entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas?

**10.** Tras la exposición a un carcinógeno mutagénico, una célula epitelial pierde su unión a las células epiteliales vecinas, se divide y pasa a formar un cáncer. ¿Qué gen puede haber mutado para causar esta pérdida de adhesión a las células vecinas?

**11.** ¿Cuál es la importancia de dirigir selectivamente los diferentes transportadores de glucosa a los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células epiteliales intestinales? ¿Cuál es el papel de las uniones estrechas en este proceso?

**12.** ¿En qué se parecen las uniones de tipo *gap* y los plasmodesmos? ¿Es probable que sean estructuras análogas u homólogas entre los animales y los vegetales?

## Bibliografía


### Estructura de la membrana plasmática

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 27-66. [R]

Branton, D., C. M. Cohen and J. Tyler. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24: 24-32. [P]

Bretscher, M. S. and S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261: 1280-1281. [R]

Diesenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3-81 resolution. *Nature* 318: 618-624. [P]

Edidin, M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* 11: 492-496. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 470-477. [R]

Jay, D. G. 1996. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell* 86: 853-854. [R]

Lasky, L. A. 1995. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 113-139. [R]

Lee, A. 2001. Membrane structure. *Curr. Biol.* 11: R811-R814. [R]

London, E. 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 480-486. [R]

Magee, T. and C. Marshall. 1999. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* 98: 9-12. [R]

Montell, C., L. Birnbaumer and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108: 595-598. [R]

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen and G. Feher. 1989. The bacterial photo synthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 607-633. [R]

Sharon, N. and H. Lis. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268(1): 82-89. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399-32402. [R]

Thompson, T. E. and T. W. Tillack. 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14: 361-386. [R]

Yu, J., D. A. Fischman and T. L. Steck. 1973. Selective solubilization of proteins and phos pholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1: 233-248. [P]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

### Transporte de moléculas pequeñas

Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda and G. W. Gould. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268: 19161-19164. [R]

Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 425-458. [R]

Borst, P. and A. H. Schinkel. 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet.* 13: 217-222. [R]

Carafoli, E. 1992. The $Ca^{2+}$ pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267: 2115-2118. [R]

Catterall, W. A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 493-531. [R]

Clapham, D. E. 1999. Unlocking family secrets: $K^+$ channel transmembrane domains. *Cell* 97: 547-550. [R]

Cole, S. P. and R. G. Deeley. 1998. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20: 931-940. [R]

Cooper, E. C. and L. Y. Jan. 1999. Ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects, and challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4759-4766. [R]

Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of $K^+$ conductivity and selectivity. *Science* 280: 69-77. [P]

Gottesman, M. M. and I. M. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 385-427. [R]

Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113. [R]

Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500-544. [P]

Jongsma, H. J. and R. Wilders. 2001. Channel opathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr. Biol.* 11: R747-R750. [R]

Kaplan, J. H. 2002. Biochemistry of Na, KATPase. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 511-535. [R]

Lanyi, J. K. 1995. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature* 375: 461-463. [R]

MacLennan, D. H., W. J. Rice and N. M. Green. 1997. The mechanism of $Ca^{2+}$ transport by sarco (endo)plasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815-28818. [R]

Neher, E. and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 44-51. [R]

Perozo, E., D. M. Cortes and L. G. Cuello. 1999. Structural rearrangements underlying $K^+$-channel activation gating. *Science* 285: 73-78. [P]

Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256: 503-512. [R]

Sansom, M. S. and R. J. Law. 2001. Membrane proteins: Aquaporins—channels without ions. *Curr. Biol.* 11: R71-R73. [R]

Unwin, N. 1993. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72/*Neuron* 10 (Suppl.): 31-41. [R]

Walmsley, A. R., M. P. Barrett, F. Bringaud and G. W. Gould. 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: Structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23: 476-481. [R]

Welsh, M. J. and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-1254. [R]

### Endocitosis

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47. [R]

Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: A mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 721-730. [R]

Liu, P., M. Rudick and R. G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277: 41295-41298. [R]

McNiven, M. A. 1998. Dynamin: A molecular motor with pinchase action. *Cell* 94: 151-154. [R]

Mostov, K., T. Su and M. ter Beest. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: Conservation and plasticity. *Nat. Cell Biol.* 5: 287-293. [R]

Nelson, W. J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258: 948-955. [R]

Parton, R. G. 2003. Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 162-167. [R]

Rabinovitch, M. 1995. Professional and nonprofessional phagocytes: An introduction. *Trends Cell Biol.* 5: 85-87. [R] Smith, C. J. and B. M. Pearse. 1999. Clathrin: Anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* 9: 335-338. [R]

Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653. [R]

Takei, K. and V. Haucke. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11: 385-391. [R]

Trowbridge, I. S., J. F. Collawn and C. R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic

pathway. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 129-161. [R]

Van Ijzendoorn, S. C. D. and D. Hoekstra. 1999. The subapical compartment: A novel sorting centre? *Trends Cell Biol.* 9: 144-149. [R]


### *Paredes celulares y matriz extracelular*


Bernfield, M., M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 729-777. [R]

Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30. [R]

Cosgrove, D. J. 2001. Plant cell walls: Wallassociated kinases and cell expansion. *Curr. Biol.* 11: R558-R559. [R]

Cosgrove, D. J. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171-201. [R]

Cyr, R. J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 153-180. [R]

Iozzo, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 609-652. [R]

Kjellen, L. and U. Lindahl. 1991. Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 443-475. [R]

Kohorn, B. D. 2001. WAKs; cell wall associated kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 529-533. [R]

Loftus, J. C., J. W. Smith and M. H. Ginsberg. 1994. Integrin-mediated cell adhesion: The extracellular face. *J. Biol. Chem.* 269: 25235-25238. [R]

Lukashev, M. E. and Z. Werb. 1998. ECM signalling: Orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8: 437-441. [R]

McDonald, J. A. 1988. Extracellular matrix assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 183-207. [R]

Perrin, R. M. 2001. Cellulose: How many cellulose synthases to make a plant? *Curr. Biol.* 11: R213-R216. [R]

Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko. 1995. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 403-434. [R]

Reiter, W. D. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 536-542. [R]

Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 229-255. [R]

Ruoslahti, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697-715. [R]

Stals, H. and D. Inze. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6: 359-364. [R]

Varner, J. E. and L.-S. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239. [R]

Vertel, B. M. 1995. The ins and outs of aggrecan. *Trends Cell Biol.* 5: 458-464. [R]

Vuorio, E. and B. de Crombrugghe. 1990. The family of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 837-872. [R]

Wight, T. N. 2002. Versican: A versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 617-623. [R]

Woods, A. and J. R. Couchman. 2001. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 578-583. [R]

Yurchenko, P. D. and J. C. Schnitty. 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577-1590. [R]


### *Interacciones célula-célula*


Chothia, C. and E. Y. Jones. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 823-862. [R]

Christofori, G. and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24: 73-76. [R]

Fukata, M. and K. Kaibuchi. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 887-897. [R]

Garrod, D. R., A. J. Merritt, and Z. Nie. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 537-545. [R]

Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava and B. E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1-44. [R]

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357. [R]

Heinlein, M. 2002. Plasmodesmata: Dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 543-552. [R]

Humphries, M. J. and P. Newham. 1998. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 8: 78-83. [R]

Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687. [R]

Knust, E. and O. Bossinger. 2002. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298: 1955-1959. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4: E83-E90. [R]

Pickard, B. G. and R. N. Beachy. 1999. Intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. *Cell* 98: 5-8. [R]

Simon, A. M. and D. A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8: 477-483. [R]

Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314. [R]

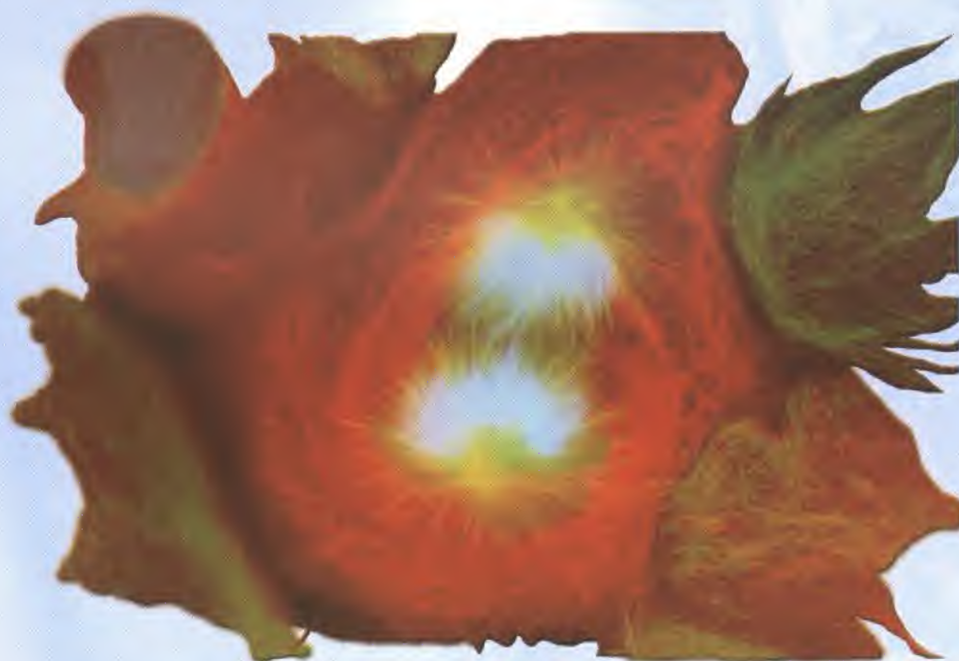
Stevenson, B. R. and B. H. Keon. 1998. The tight junction: Morphology to molecules. *Ann. Rev. Cell Biol.* 14: 89-109. [R]

Tsukita, S. and M. Furuse. 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cell ular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 531-536. [R]

Yagi, T. and M. Takeichi. 2000. Cadherin superfamily genes: Functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14: 1169-1180. [R]

Sección **IV**

# *Regulación celular*



# 13 Señalización celular



TODAS LAS CÉLULAS RECIBEN SEÑALES DESDE SU MEDIO Y RESPONDEN A ESTAS SEÑALES. Incluso la bacteria más sencilla capta y se desplaza hacia concentraciones elevadas de nutrientes, como la glucosa o los aminoácidos. Muchos eucariotas unicelulares también responden a moléculas señalizadoras secretadas por otras células, permitiendo, de este modo, la comunicación célula-célula. Por ejemplo, el apareamiento entre células de levadura se señaliza mediante péptidos que son secretados por una célula y se unen a receptores en la superficie de la otra. Sin embargo, es en los organismos pluricelulares donde la comunicación célula-célula alcanza su grado más elevado de complejidad. Mientras que las células procariotas y las de los organismos eucariotas unicelulares son, en gran medida, autónomas, el comportamiento de cada célula en las plantas y animales pluricelulares ha de ser regulado cuidadosamente para satisfacer los requerimientos del organismo como un todo. Esto se consigue a través de un amplio repertorio de moléculas señalizadoras que, bien son secretadas, o bien se expresan en la superficie celular, las cuales se unen a receptores expresados en otras células, integrando y coordinando de esta manera las funciones de las distintas células individuales que constituyen organismos tan complejos como el ser humano.

La unión de la mayoría de estas moléculas señalizadoras a sus receptores provoca una cascada de reacciones intracelulares que son las que regulan, en gran medida, los diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo su metabolismo, la motilidad, la proliferación, su supervivencia y la diferenciación. La comprensión de los mecanismos moleculares que constituyen estas vías de señalización celular se ha convertido, por tanto, en un área prioritaria de investigación. El interés en este campo es aun mayor por el hecho de que muchos tipos de cáncer surgen debido a una alteración en las vías de señalización celular que controlan la proliferación y supervivencia de las células sanas. Por su parte, muchos de nuestros conocimientos acerca de los mecanismos de señalización celular proceden del estudio de células cancerosas, lo que supone un claro ejemplo de la fructífera relación entre la medicina y la investigación básica en la biología molecular y celular.

## Moléculas señalizadoras y sus receptores

Son muchos los diferentes tipos de moléculas que transmiten información entre las células de los organismos pluricelulares. Aunque todas ellas actúan como ligandos que se unen a receptores expresados por las células diana, existe una variabilidad considerable en la estructura y función de los distintos tipos de moléculas que actúan como transmisores de señales. En cuanto a su estructura, el

rango de complejidad de las moléculas señalizadoras utilizadas por plantas y animales varía desde los gases sencillos hasta las proteínas. Algunas de estas moléculas transmiten las señales a través de largas distancias, mientras que otras actúan localmente transfiriendo la información entre células vecinas. Además, las moléculas señalizadoras difieren en su modo de acción sobre las células diana. Algunas de estas moléculas son capaces de atravesar la membrana plasmática y se unen a receptores intracelulares en el citoplasma o en el núcleo, mientras que la mayoría se une a receptores que son expresados en la superficie de las células diana. En las secciones siguientes se tratarán los principales tipos de moléculas señalizadoras y los receptores con los que interaccionan. Posteriormente, se abordarán los mecanismos mediante los que los receptores celulares de superficie regulan el comportamiento celular.

## *Tipos de señalización célula-célula*

La señalización celular tiene lugar bien a través de la interacción directa entre una célula y la célula vecina, bien mediante la acción de moléculas señalizadoras secretadas (Fig. 13.1). La señalización mediante interacción directa célula-célula (o célula-matriz extracelular) desempeña un papel crítico en la regulación del comportamiento de las células en los tejidos animales. Por ejemplo, las integrinas y cadherinas (que fueron tratadas en el Capítulo anterior) funcionan no sólo como moléculas de adhesión celular, sino también como moléculas señalizadoras que regulan la proliferación y supervivencia celular en respuesta al contacto célula-célula o célula-matriz extracelular. Además, las células expresan variedad de receptores de superficie que interaccionan con las moléculas señalizadoras de superficie de las células vecinas. Este tipo de señalización mediante interacción directa célula-célula desempeña un papel fundamental en la regulación de las múltiples interacciones que tienen lugar entre los distintos tipos celulares durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de los tejidos adultos.

Los diferentes tipos de señalización mediante moléculas secretadas se suelen dividir en tres grandes clases en función de la distancia recorrido por la molécula señalizadora. En la **señalización endocrina**, las moléculas señalizadoras (**hormonas**) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan a través de la circulación, actuando sobre células diana localizadas en lugares alejados en el organismo. Un ejemplo clásico lo proporciona la hormona esteroidea estrógeno, que es producida por el ovario y estimula el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor femenino y de los caracteres sexuales secundarios. En los animales se producen más de 50 hormonas distintas por las glándulas endocrinas, entre las que se incluyen la pituitaria, tiroides, paratiroides, páncreas, glándulas suprarrenales y gónadas.

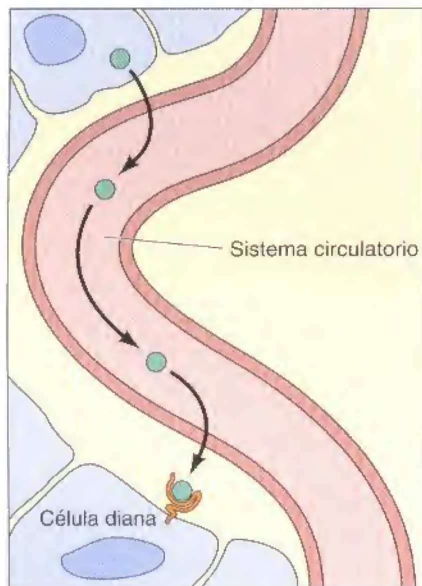
A diferencia de las hormonas, algunas moléculas señalizadoras actúan localmente, afectando al comportamiento de las células próximas. En la **señalización paracrina**, una molécula liberada por una célula actúa sobre las células diana vecinas. Un ejemplo lo proporciona la acción de los neurotransmisores que transportan la señal entre células nerviosas en la sinapsis. Por último, algunas células responden frente a señales que producen ellas mismas. Un ejemplo importante de esta **señalización autocrina** es la respuesta de las células del sistema inmune de los vertebrados frente a antígenos extraños. Algunos tipos de linfocitos T responden a la estimulación antigénica sintetizando un factor de creci-

**Señalización directa célula-célula**

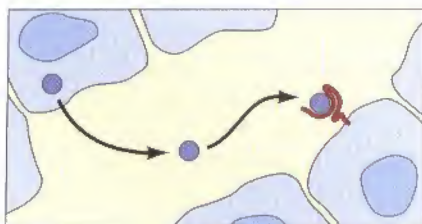


**Señalización mediante moléculas secretadas**

(A) Señalización endocrina




(B) Señalización paracrina



(C) Señalización autocrina

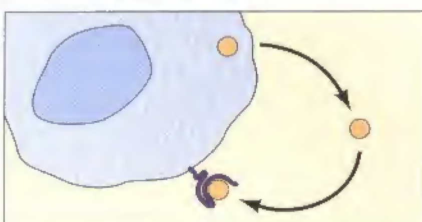


*Figura 13.1*
**Tipos de señalización célula-célula.** La señalización celular puede tener lugar bien mediante contacto directo célula-célula, o bien a través de la acción de moléculas señalizadoras secretadas. (A) En la señalización endocrina, las hormonas se transportan a través del sistema circulatorio y actúan sobre células diana alejadas. (B) En la señalización paracrina, la molécula liberada por una célula actúa localmente afectando a células diana próximas. (C) En la señalización autocrina, la célula responde a una molécula señal producida por ella misma.

miento que induce su propia proliferación, lo que supone, por tanto, el aumento del número de linfocitos T con capacidad de respuesta y la amplificación de la respuesta inmune. También merece la pena destacar que una señalización autocrina anormal suele contribuir al crecimiento incontrolado de las células cancerosas (véase Cap. 15). En este caso, la célula cancerosa produce un factor de crecimiento frente al que es susceptible, induciendo continuamente su proliferación incontrolada.

## *Hormonas esteroideas y superfamilia de receptores de esteroides*

Como ya se ha comentado, todas las moléculas señalizadoras actúan mediante la unión a receptores que son expresados por las células diana. En muchos casos, estos receptores se expresan en la superficie de la célula diana, pero otros receptores son proteínas intracelulares que se localizan en el citosol o en el núcleo. Estos receptores intracelulares interaccionan con moléculas señalizadoras pequeñas e hidrofóbicas que son capaces de difundir a través de la membrana plasmática. Las **hormonas esteroideas** son el típico ejemplo de este tipo de moléculas señalizadoras, entre las que también se incluyen la hormona tiroidea, la vitamina $D_3$, y el ácido retinoico (Fig. 13.2).

Las hormonas esteroideas (que incluyen a la testosterona, estrógeno, progesterona, los corticosteroides y la ecdisona) se sintetizan a partir del colesterol. La **testosterona**, **estrógeno** y **progesterona** son esteroides sexuales que son producidos por las gónadas. Los corticosteroides son producidos por la glándula suprarrenal. Estos incluyen a los **glucocorticoides**, que actúan sobre distintos tipos de células estimulando la producción de glucosa, y los **mineralocorticoides**, que actúan sobre el riñón regulando el equilibrio salino e hídrico. La **ecdisona** es una hormona de insectos que desempeña un papel fundamental en el desarrollo activando la metamorfosis de la larva a adulto. Los **brasinosteroides**

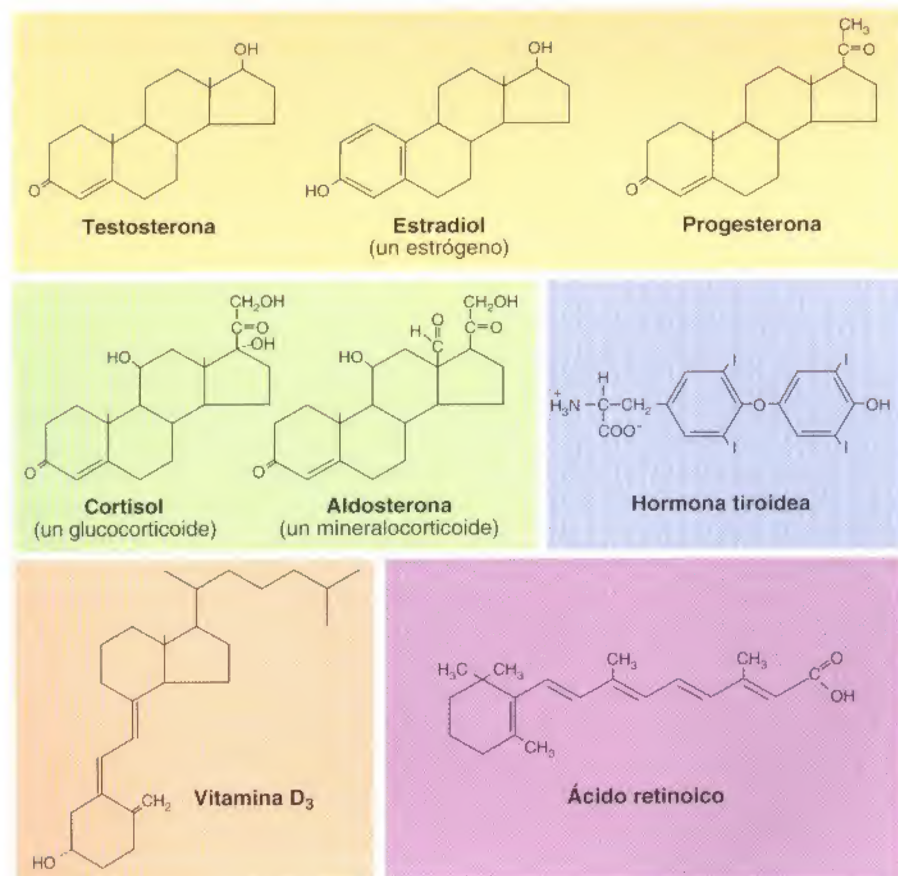



*Figura 13.2*
**Estructura de las hormonas esteroideas, hormona tiroidea, vitamina $D_3$ y ácido retinoico.** Los esteroides incluyen a las hormonas sexuales (testosterona, estrógeno, y progesterona), glucocorticoides y mineralocorticoides.

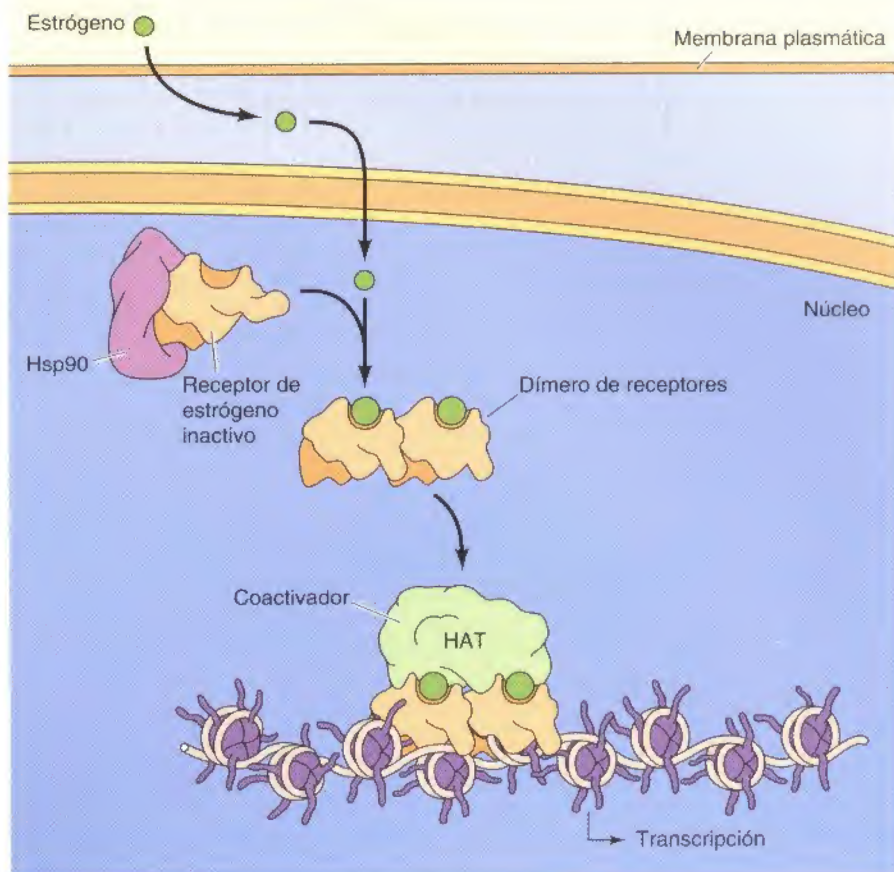



*Figura 13.3*
**Acción del estrógeno.** El estrógeno difunde a través de la membrana plasmática y se une a su receptor en el núcleo. En ausencia de la hormona, el receptor del estrógeno se encuentra unido a Hsp90. La unión al estrógeno desplaza al Hsp90 del receptor, y permite la formación de dímeros de receptor, los cuales se unen al ADN, se asocian con coactivadores que poseen actividad histona acetiltransferasa (HAT), y estimulan la transcripción de sus genes diana.

son hormonas esteroídicas específicas de plantas que controlan un cierto número de procesos del desarrollo, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular.

Aunque la hormona tiroidea, la vitamina $D_3$ y el ácido retinoico son estructural y funcionalmente diferentes a los esteroides, comparten un mecanismo de acción común en las células diana. La **hormona tiroidea** se sintetiza a partir de la tirosina en la glándula tiroidea; desempeña un papel importante en el desarrollo y en la regulación del metabolismo. La **vitamina $D_3$** regula el metabolismo del calcio y el crecimiento del hueso. El **ácido retinoico** y sus derivados (**retinoides**), sintetizados a partir de la vitamina A, juegan un papel importante en el desarrollo de los vertebrados.

Debido a su carácter hidrofóbico, las hormonas esteroideas, la hormona tiroidea, la vitamina $D_3$ y el ácido retinoico son capaces de penetrar en la célula difundiendo a través de la membrana plasmática (Fig. 13.3). Una vez en el interior celular, se unen a receptores intracelulares que son expresados por las células diana sensibles a hormonas. Estos receptores, que son miembros de una familia de proteínas denominada **superfamilia de los receptores de esteroides**, son factores de transcripción que contienen dominios similares implicados en la unión al ligando, en la unión al ADN y en la activación de la transcripción. La unión al ligando regula su función como activadores o represores de sus genes diana, por lo que las hormonas esteroideas y moléculas relacionadas son reguladores directos de la expresión génica.

La unión al ligando tiene efectos distintos según los diferentes receptores. Algunos miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides, como el receptor de estrógeno y el receptor de glucocorticoides, son incapaces de unirse al ADN en ausencia de la hormona. El receptor de estrógeno, por ejemplo, está unido a chaperonas Hsp90 en ausencia de la hormona (Fig. 13.3). La unión del estrógeno induce un cambio conformacional en el receptor, desplazando a Hsp90 y dando lugar a la formación de dímeros de receptores que se unen a las

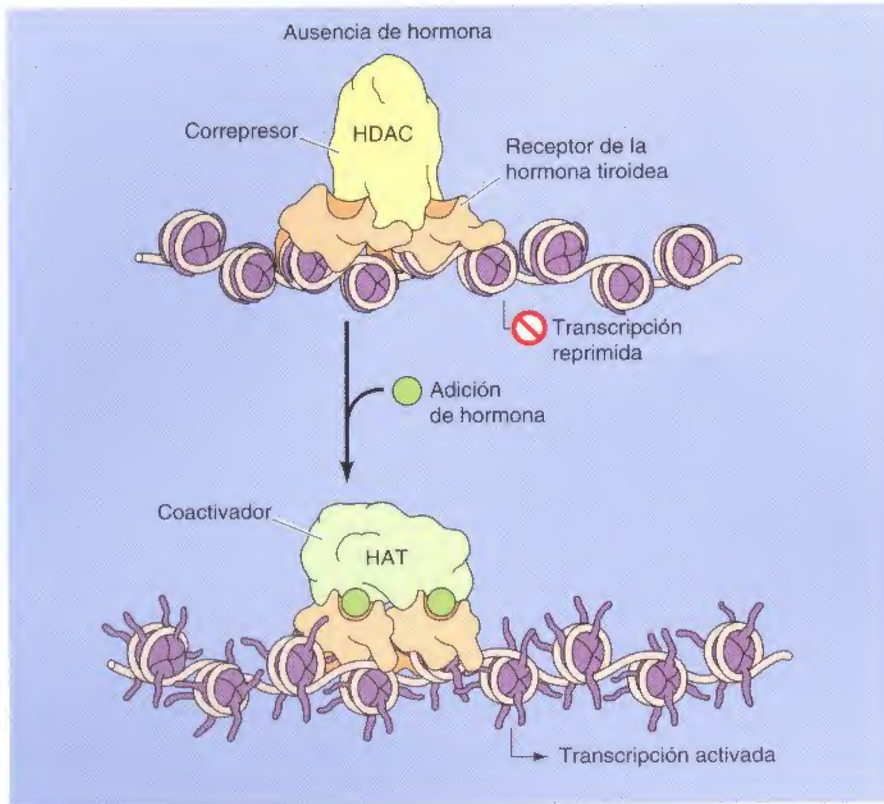



*Figura 13.4*
**Regulación génica mediada por el receptor de la hormona tiroidea.** El receptor de la hormona tiroidea se une al ADN tanto en ausencia como en presencia de la hormona. Sin embargo, la unión de la hormona cambia la función del receptor, de represor a activador de la transcripción de los genes diana. En ausencia de la hormona, el receptor se asocia con correpresores que poseen actividad histona deacetilasa (HDAC). En presencia de la hormona, el receptor se asocia con coactivadores que poseen actividad histona acetiltransferasa (HAT).

secuencias reguladoras del ADN y activan la transcripción de los genes diana. En otros casos, el receptor se une al ADN tanto en presencia como en ausencia de la hormona, pero la unión de la hormona modifica la actividad del receptor como molécula reguladora de la transcripción. Por ejemplo, en ausencia de la hormona, el receptor de la hormona tiroidea está asociado con un complejo correpresor y reprime la transcripción de sus genes diana (Fig. 13.4). La unión de la hormona induce un cambio conformacional que resulta en la interacción del receptor con coactivadores en lugar de correpresores, desencadenando la activación transcripcional de los genes inducibles por la hormona tiroidea.

## *Óxido nítrico y monóxido de carbono*

El gas sencillo óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora paracrina fundamental en los sistemas nervioso, inmune y circulatorio. Al igual que las hormonas esteroideas, el NO es capaz de difundir directamente a través de la membrana plasmática de sus células diana. Sin embargo, el fundamento molecular de la acción del NO es diferente al de la acción de las hormonas esteroideas; en vez de unirse a un receptor que regule la transcripción, el NO altera la actividad de enzimas diana intracelulares.

El óxido nítrico se sintetiza a partir del aminoácido arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (Fig. 13.5). Una vez sintetizado, el NO difunde fuera de la célula y puede actuar localmente afectando a células próximas. Su acción se restringe a estos efectos locales ya que el NO es extremadamente inestable, con una vida media de sólo unos pocos segundos. Un ejemplo bien caracterizado de la acción del NO es la señalización de la dilatación de los vasos sanguíneos. El primer paso en este proceso es la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, desde los terminales de las células nerviosas a la pared de los vasos sanguíneos. Estos neurotransmisores actúan sobre las células endoteliales estimulando la síntesis de NO. El NO difunde hasta las células vecinas del músculo liso donde reacciona con el hierro unido al centro activo de la enzima guanilato ciclasa. Esto aumenta la actividad enzimática, da lugar a la síntesis del segundo

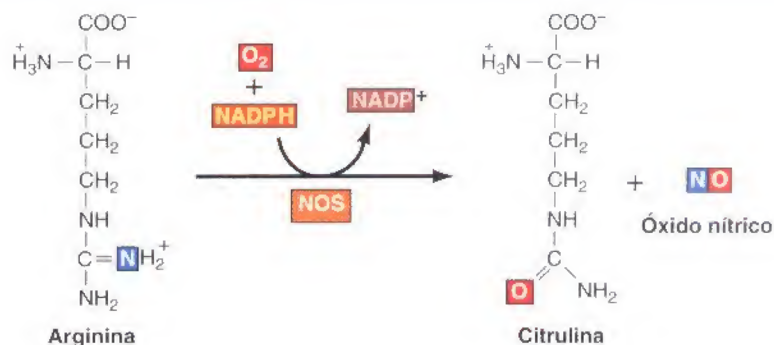
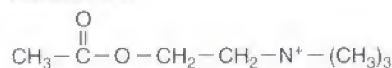
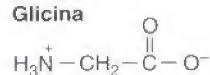



*Figura 13.5*
**Síntesis del óxido nítrico.** El enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la formación de óxido nítrico a partir de arginina.

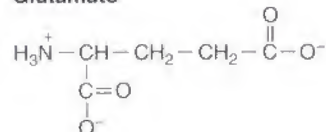
**Acetilcolina**



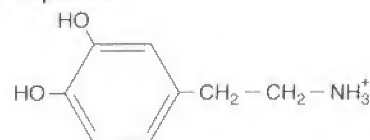

**Glicina**



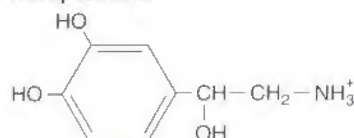

**Glutamato**



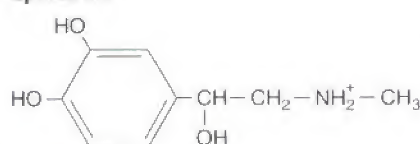

**Dopamina**



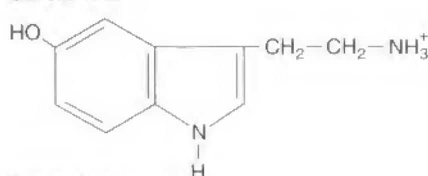

**Norepinefrina**



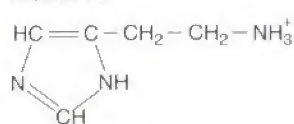

**Epinefrina**




**Serotonina**




**Histamina**




**Ácido γ-aminobutírico** (GABA)

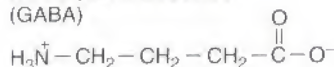



*Figura 13.6*
**Estructura de neurotransmisores representativos.** Los neurotransmisores son moléculas hidrofílicas que se unen a receptores celulares de superficie.

mensajero GMP cíclico (se hablará de él posteriormente en este Capítulo), el cual induce la relajación de las células musculares y la dilatación de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, el NO es la señal responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos que conduce a la erección del pene. También es interesante destacar que el uso médico de la nitroglicerina en el tratamiento de enfermedades cardíacas está basado en su conversión a NO, el cual dilata los vasos sanguíneos coronarios incrementando el flujo sanguíneo al corazón.

Otro gas sencillo, el monóxido de carbono (CO), también funciona como una molécula señalizadora en el sistema nervioso. El CO está íntimamente relacionado con el NO y parece que actúa de igual manera como neurotransmisor que como mediador de la vasodilatación. La síntesis del CO en células cerebrales, al igual que la del NO, es estimulada por neurotransmisores. Asimismo, el CO estimula a la guanilato ciclasa, la cual parece ser la principal diana fisiológica de la señalización mediante CO.

## *Neurotransmisores*

Los neurotransmisores llevan las señales entre las neuronas o desde las neuronas a algún otro tipo de célula diana (como las células musculares). Son un grupo diverso de moléculas pequeñas, hidrofílicas que incluye a la acetilcolina, dopamina, epinefrina (adrenalina), serotonina, histamina, glutamato, glicina, y ácido γ-amino butírico (GABA) (Fig. 13.6). La señal de liberación de los neurotransmisores es la llegada de un potencial de acción al terminal de la neurona (véase Fig. 12.22). Una vez liberados, los neurotransmisores difunden a través del espacio sináptico y se unen a los receptores de superficie de la célula diana. Hay que destacar que algunos neurotransmisores también actúan como hormonas. Por ejemplo, la epinefrina funciona como un neurotransmisor y como una hormona producida por la glándula suprarrenal para activar la hidrólisis del glucógeno en las células musculares.

Debido a que los neurotransmisores son moléculas hidrofílicas, no son capaces de atravesar la membrana plasmática de las células diana. Por ello, y a diferencia de las hormonas esteroideas y el NO o el CO, el mecanismo de actuación de los neurotransmisores es mediante la unión a receptores celulares de superficie. Muchos receptores de neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando, como el receptor de acetilcolina, mencionado en el Capítulo anterior (véase Fig. 12.23). El neurotransmisor que se une a estos receptores induce un cambio conformacional tal que se abre el canal iónico, lo que permite una variación del flujo de iones en la célula diana. Otros receptores de neurotransmisores están acoplados a proteínas G —un grupo importante de moléculas señalizadoras (tratadas posteriormente en este Capítulo) que acoplan a los receptores de superficie celular a diversas respuestas intracelulares—. En el caso de los receptores de neurotransmisores, las proteínas G asociadas actúan regulando indirectamente la actividad de los canales iónicos.

## *Hormonas peptídicas y factores de crecimiento*

En los animales, las moléculas señalizadoras más diversas son los péptidos, cuyo tamaño oscila entre sólo unos pocos hasta más de cien aminoácidos. Este

**TABLA 13.1.** Hormonas peptídicas, neuropéptidos y factores de crecimiento representativos

| Molécula señal | Tamaño[a] | Función[b] |
|---|---|---|
| **Hormonas peptídicas** | | |
| Insulina | A = 21, B = 30 | Regulación de la absorción de la glucosa; estimula la proliferación celular |
| Glucagón | 29 | Estimula la síntesis de la glucosa |
| Hormona del crecimiento | 191 | Estimula el crecimiento |
| Hormona estimulante del folículo (FSH) | $\alpha = 92$, $\beta = 118$ | Estimula el desarrollo de los oocitos y de los folículos ováricos |
| Prolactina | 198 | Estimula la producción de leche |
| **Neuropéptidos y neurohormonas** | | |
| Sustancia P | 11 | Transmisión sináptica sensorial |
| Oxitocina | 9 | Estimula la contracción del músculo liso |
| Vasopresina | 9 | Estimula la reabsorción de agua en el riñón |
| Encefalinas | 5 | Analgésicas |
| $\beta$-Endorfina | 31 | Analgésica |
| **Factores de crecimiento** | | |
| Factor de crecimiento nervioso (NGF) | 118 | Supervivencia y diferenciación neuronal |
| Factor de crecimiento epidérmico (EGF) | 53 | Proliferación de muchos tipos celulares |
| Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) | A = 125, B = 109 | Proliferación de fibroblastos y de otros tipos celulares |
| Interleuquina-2 | 133 | Proliferación de linfocitos T |
| Eritropoyetina | 166 | Desarrollo de glóbulos rojos |

[a] El tamaño se expresa en número de aminoácidos. Algunas hormonas y factores de crecimiento están constituidos por dos cadenas polipeptídicas diferentes, las cuales se designan A y B o $\alpha$ y $\beta$.
[b] La mayoría de estas hormonas y factores de crecimiento tienen otras funciones además de las arriba indicadas.

grupo de moléculas señalizadoras incluye a las hormonas peptídicas, neuropéptidos, y un amplio espectro de factores de crecimiento polipeptídicos (Tabla 13.1). Ejemplos bien conocidos de **hormonas peptídicas** son la insulina, el glucagón y las hormonas producidas por la glándula pituitaria (hormona del crecimiento, hormona estimulante del folículo, prolactina y otras).

Algunas neuronas secretan **neuropéptidos** en vez de las moléculas neurotransmisoras de pequeño tamaño a las que nos referimos en la sección anterior. Algunos de estos péptidos, como las **encefalinas** y las **endorfinas**, funcionan no sólo como neurotransmisores en la sinapsis sino también como **neurohormonas** que actúan sobre células alejadas. Las encefalinas y las endorfinas se han estudiado ampliamente debido a su actividad como analgésicos naturales que disminuyen la respuesta de dolor en el sistema nervioso central. Fueron descubiertas durante estudios acerca de la adicción a las drogas, y son compuestos producidos por el propio organismo que se unen a los mismos receptores de superficie de las células cerebrales a los que se une la morfina.

Los **factores de crecimiento** polipeptídicos incluyen una amplia gama de moléculas señalizadoras que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células animales. El primero de estos factores (el **factor de crecimiento nervioso**, o **NGF**) fue descubierto por Rita Levi-Montalcini en los años 50. El NGF pertenece a una familia de polipéptidos (denominados **neurotrofinas**) que regulan el desarrollo y la supervivencia de las neuronas. Durante el transcurso de experimentos con el NGF, Stanley Cohen descubrió casualmente un factor diferente (denominado **factor de crecimiento epidérmico**, o **EGF**) que estimula la proliferación celular. El EGF, un polipéptido de 53 aminoácidos (Fig. 13.7), se considera el prototipo de una amplia serie de factores de crecimiento que desempeñan un papel fundamental en el control de la proliferación celular, tanto durante el desarrollo embrionario como en el organismo adulto.

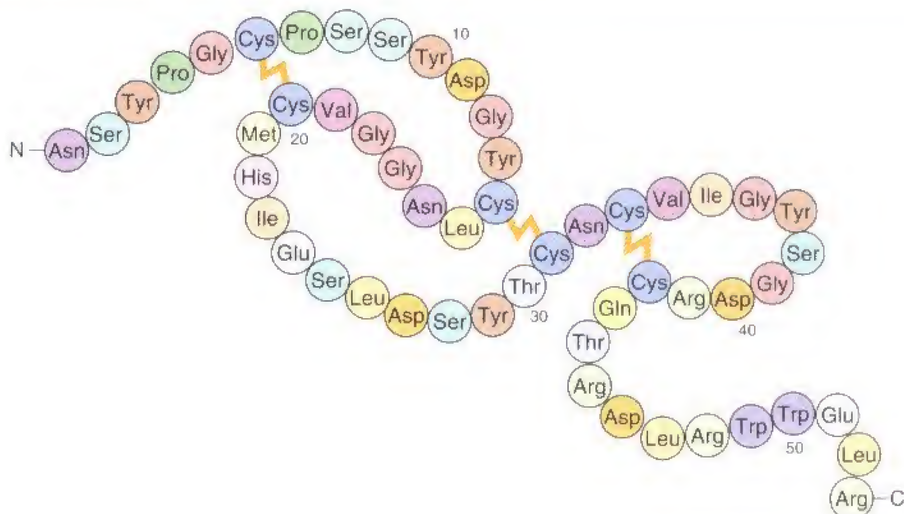



*Figura 13.7*
**Estructura del factor de crecimiento epidérmico (EGF).** El EGF es una única cadena polipeptídica constituida por 53 aminoácidos. Se indican los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. (A partir de G. Carpenter y S. Cohen, 1979. *Ann. Rev. Biochem.* 48:193.)

Un buen ejemplo de la acción de los factores de crecimiento lo proporciona la actividad del **factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** en la cicatrización de las heridas. El PDGF se almacena en las plaquetas y se libera durante la coagulación sanguínea en el lugar de la herida. Entonces, estimula la proliferación de fibroblastos en la proximidad del coágulo, lo que contribuye a la regeneración del tejido dañado. Los miembros de otro gran grupo de factores de crecimiento polipeptídicos (denominados **citoquinas**) regulan el desarrollo y la diferenciación de las células sanguíneas y controlan la actividad de los linfocitos durante la respuesta inmune. Otros factores de crecimiento polipeptídicos (**factores de crecimiento anclados a la membrana**) permanecen asociados a la membrana plasmática en vez de ser secretados al fluido extracelular; por tanto, actúan específicamente como moléculas señalizadoras en las interacciones directas célula-célula.

Las hormonas peptídicas, los neuropéptidos y los factores de crecimiento no pueden atravesar la membrana plasmática de las células diana, por lo que actúan mediante la unión a receptores de superficie celulares, lo que se tratará posteriormente en este Capítulo. Tal y como cabría esperar del papel crucial que desempeñan los factores de crecimiento polipeptídicos en el control de la proliferación celular, las alteraciones en la señalización mediada por factores de crecimiento son la fuente de multitud de enfermedades, incluyendo muchos tipos de cáncer. Por ejemplo, la expresión alterada de un receptor relacionado con el receptor del EGF es un factor importante para el desarrollo del cáncer de ovario y de pulmón en el hombre.

### *Eicosanoides*

Muchos tipos de lípidos sirven como moléculas señalizadoras que, a diferencia de las hormonas esteroideas, actúan mediante la unión a receptores de superficie celular. Los más importantes de este tipo de moléculas son los miembros de una clase de lípidos denominados **eicosanoides**, que incluyen a las **prostaglandinas**, la **prostaciclina**, los **tromboxanos** y los **leucotrienos** (Fig. 13.8). Los eicosanoides se hidrolizan rápidamente, por lo que actúan localmente en vías de señalización autocrinas o paracrinas. Estimulan una gran diversidad de respuestas en las células diana, como por ejemplo la agregación plaquetaria, la inflamación y la contracción del músculo liso.

Todos los eicosanoides se sintetizan a partir del ácido araquidónico, que se forma a partir de los fosfolípidos. El primer paso en la vía que conduce a la síntesis tanto de prostaglandinas como de tromboxanos es la transformación del ácido araquidónico en la prostaglandina $H_2$. Es de destacar que la enzima que cataliza esta reacción (la ciclooxigenasa) es la diana de la aspirina y de otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. Mediante la inhibición de

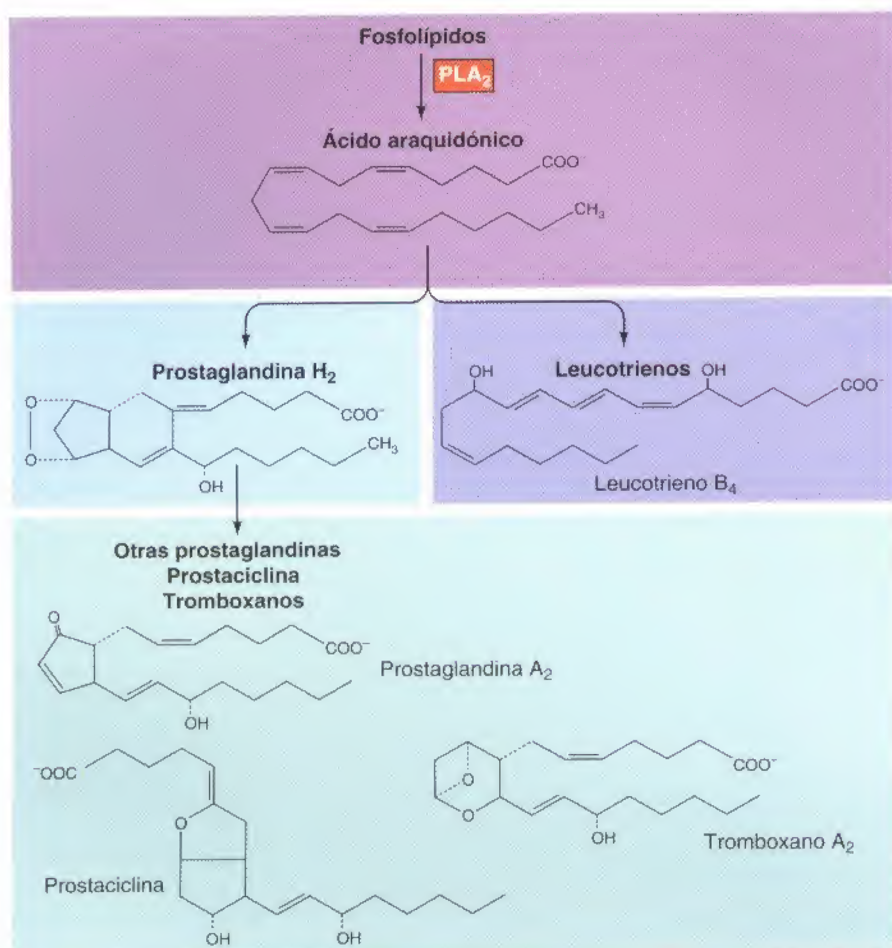



*Figura 13.8*
**Síntesis y estructura de los eicosanoides.** Los eicosanoides incluyen a las prostaglandinas, la prostaciclina, los tromboxanos y los leucotrienos. Son sintetizados a partir del ácido araquidónico, el cual se forma a partir de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por la fosfolipasa $A_2$ ($PLA_2$). El ácido araquidónico puede, a partir de aquí, seguir dos caminos metabólicos alternativos: una vía lleva a la síntesis de las prostaglandinas, la prostaciclina y los tromboxanos, mientras que la otra conduce a la síntesis de los leucotrienos.

la síntesis de las prostaglandinas, la aspirina reduce la inflamación y el dolor. Mediante la inhibición de la síntesis de los tromboxanos, la aspirina reduce la agregación plaquetaria y la coagulación. Debido a esta acción, se suelen recetar pequeñas dosis diarias de aspirina para prevenir los accidentes cerebrovasculares. Además, se ha descubierto que la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la frecuencia del cáncer de colon tanto en modelos animales como en humanos, lo que se debe, aparentemente, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que estimulan la proliferación celular y promueven el desarrollo del cáncer.

### *Hormonas vegetales*

El crecimiento y el desarrollo de las plantas está regulado por un grupo de moléculas pequeñas denominadas **hormonas vegetales**. Los niveles de estas moléculas en la planta se modifican de manera característica por factores ambientales, como la luz o una infección, de tal manera que así se coordina la respuesta de los tejidos en distintas partes de la planta a las señales ambientales.

Las hormonas vegetales se suelen dividir en cinco clases principales: **auxinas**, **giberelinas**, **citoquininas**, **ácido abscísico** y **etileno** (Fig. 13.9), aunque recientemente se han descubierto otras hormonas vegetales adicionales. La primera hormona vegetal que se identificó fue la auxina, y los experimentos que condujeron a su descubrimiento los realizó Charles Darwin en los años 80 del siglo XIX. Uno de los efectos de las auxinas es inducir la elongación de la célula vegetal mediante el debilitamiento de la pared celular (véase Fig. 12.49). Además, las auxinas regulan otros muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la división celular y la diferenciación. Igualmente, las otras hormonas vegetales tienen diversos efectos sobre sus tejidos diana, que incluyen la elon-

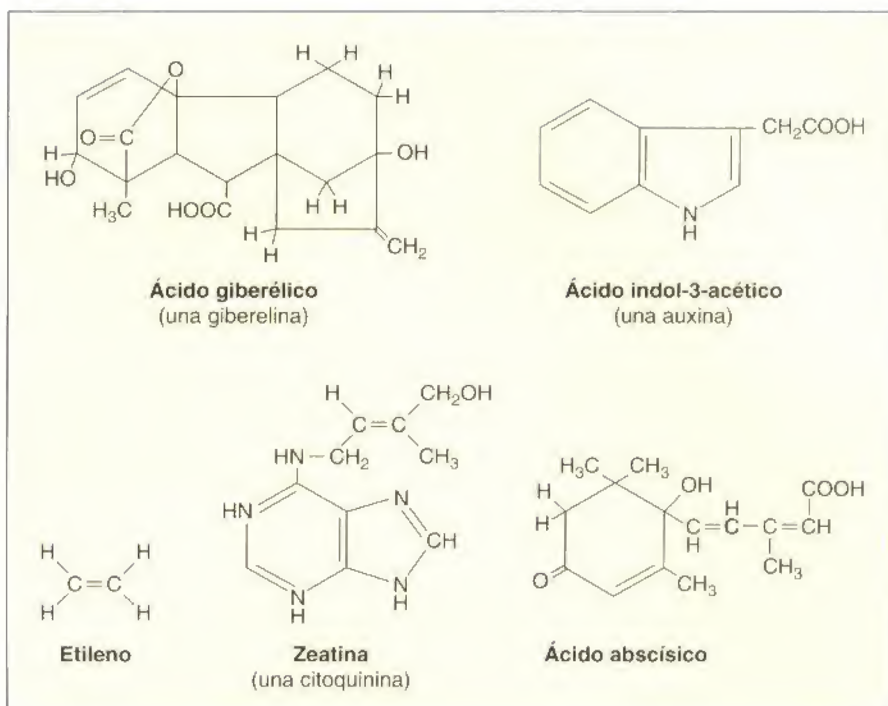



*Figura 13.9*
**Estructura de las hormonas vegetales.**

gación del tallo (giberelinas), la maduración del fruto (etileno), la división celular (citoquininas) y la inhibición de la germinación (ácido abscísico).

Las vías de señalización activadas por estas hormonas en plantas emplean una variedad de mecanismos que se conservan en las células animales, además de un número de elementos que son exclusivos de plantas. Por ejemplo, un vía bien estudiada, que se descubrió mediante el análisis genético de *Arabidopsis thaliana*, señaliza la respuesta de las células de la planta al etileno. Elementos de esta vía incluyen un receptor de etileno en la superficie de la planta, una proteína quinasa relacionada con las proteínas quinasas Raf de las células animales, y un nuevo factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta al etileno.

## Funciones de los receptores de la superficie celular

Como ya se ha visto, la mayoría de los ligandos responsables de la señalización célula-célula (incluidos los neurotransmisores, las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento) se unen a receptores de la superficie de las células diana. Por lo tanto, un reto fundamental en la comprensión de la señalización célula-célula es desenmascarar los mecanismos mediante los que los receptores celulares de superficie transmiten las señales iniciadas por la unión del ligando. Como ya se describió en el Capítulo 12, algunos receptores de los neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligando que controlan de manera directa el flujo de iones a través de la membrana plasmática. En cambio, otros receptores de superficie, entre los que se encuentran los receptores de las hormonas peptídicas y los de los factores de crecimiento, actúan regulando la actividad de proteínas intracelulares. Estas proteínas, a su vez, transmiten las señales desde el receptor a un conjunto de dianas intracelulares adicionales, que suelen ser frecuentemente factores de transcripción. Así, la unión a un receptor en la superficie de la célula genera una cascada de reacciones intracelulares, que acaban alcanzando al núcleo celular y que dan lugar a alteraciones programadas de la expresión génica. Aquí se tratarán las funciones de las principales clases de receptores de superficie, mientras que en la siguiente sección de este capítulo se tratarán las rutas de señalización intracelular a partir de los receptores.

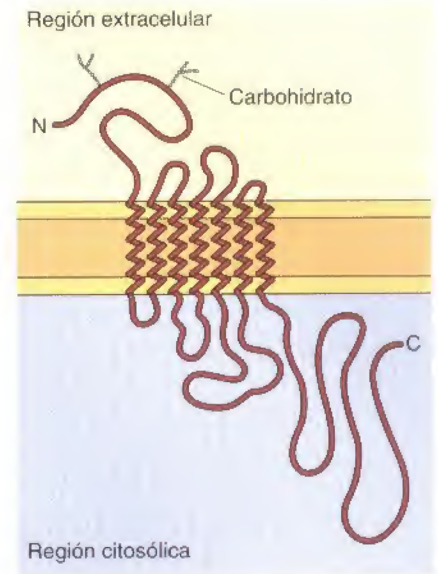



*Figura 13.10*
**Estructura de un receptor asociado a proteína G.** Los receptores asociados a las proteínas G se caracterizan por tener siete hélices $\alpha$ transmembrana.

## *Receptores asociados a proteínas G*

La familia más numerosa de receptores de la superficie celular transmite las señales al interior de la célula a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina, denominadas **proteínas G**. Se han identificado más de mil de estos **receptores asociados a proteínas G,** entre los que se incluyen los receptores de muchos neurotransmisores, de neuropéptidos y de hormonas peptídicas. Además, la familia de los receptores asociados a proteínas G incluye gran número de receptores responsables de las funciones del olfato, vista y gusto.

Los receptores asociados a proteínas G son un grupo de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, caracterizadas por tener siete hélices $\alpha$ transmembrana (Fig. 13.10). La unión del ligando al dominio extracelular de estos receptores induce un cambio conformacional que permite al dominio citosólico del receptor unirse a una proteína G unida a la cara interna de la membrana plasmática. Esta interacción activa a la proteína G, la cual se disocia del receptor y transmite la señal a una diana intracelular, que puede ser una enzima o un canal iónico.

El descubrimiento de las proteínas G se produjo a partir del estudio de hormonas (como la epinefrina) que regulan la síntesis del AMP cíclico (AMPc) en las células diana. Como se comentará posteriormente en este capítulo, el AMPc es un segundo mensajero importante que actúa como mediador de la respuesta celular a diversas hormonas. En los años 70, Martin Rodbell y col. realizaron el descubrimiento clave de que el GTP es necesario para la estimulación hormonal de la adenilato ciclasa (la enzima responsable de la formación de AMPc). Esto condujo a su vez, al descubrimiento de que una proteína que une nucleótidos de guanina (denominada proteína G) era un intermediario de la activación de la adenilato ciclasa (Fig. 13.11). Desde entonces, se ha encontrado un vasto conjunto de proteínas G que actúan a modo de interruptores fisiológicos, regulando la actividad de diversas dianas intracelulares en respuesta a señales extracelulares.

Las proteínas G están constituidas por tres subunidades, designadas $\alpha$, $\beta$ y $\gamma$ (Fig. 13.12). Frecuentemente se les denomina **proteínas G heterotriméricas** para distinguirlas de otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, como la proteína Ras, a la que nos referiremos más adelante. La subunidad $\alpha$ se une a los nucleótidos de guanina, que regulan la actividad de la proteína G. En el estado inactivo, $\alpha$ se une al GDP formando un complejo con $\beta$ y $\gamma$. La unión de la hormona induce un cambio conformacional tal en el receptor que el dominio citosólico de éste interacciona con la proteína G estimulando la liberación del

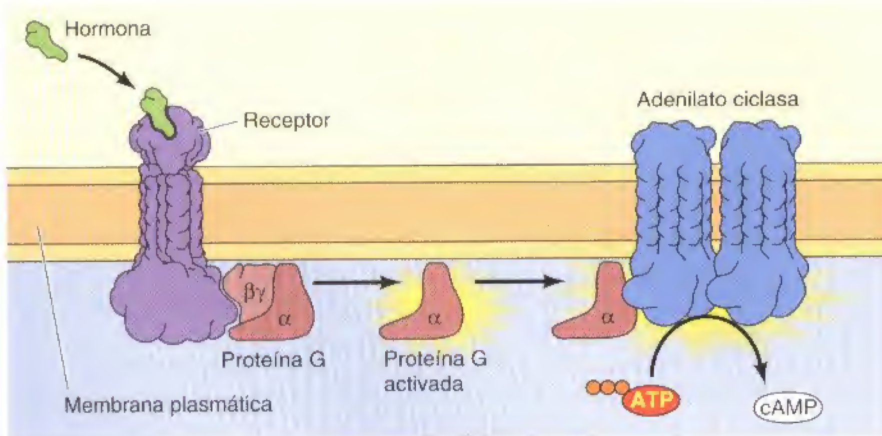



*Figura 13.11*
**Activación hormonal de la adenilato ciclasa.** La unión de la hormona induce la interacción del receptor con la proteína G. Entonces, la subunidad $\alpha$ activada de la proteína G se disocia del receptor y estimula a la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión del ATP a AMPc.

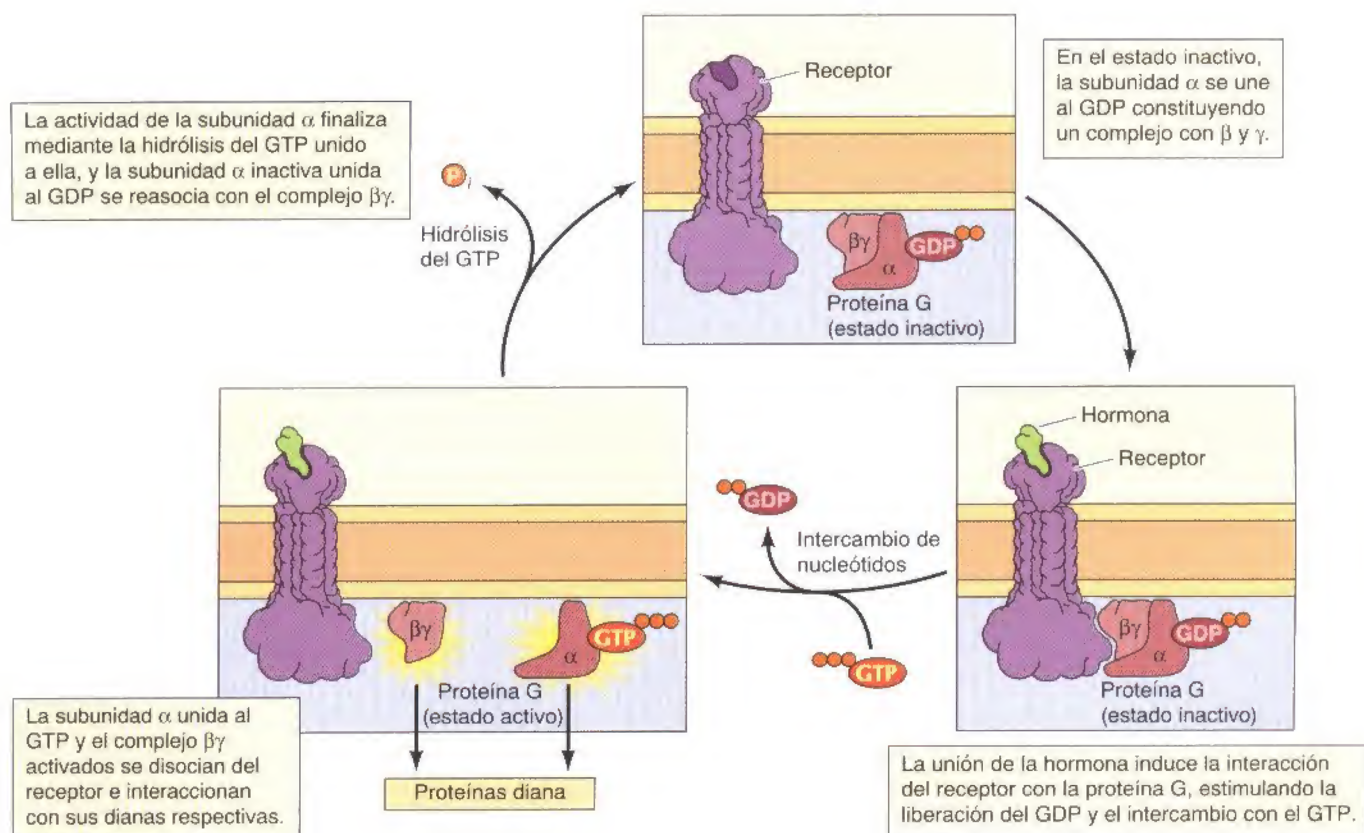



*Figura 13.12*
**Regulación de las proteínas G.**

GDP y su intercambio por GTP. La subunidad $\alpha$ unida al GTP, ahora activada, se disocia de $\beta$ y $\gamma$, que permanecen unidas constituyendo un complejo $\beta\gamma$. Tanto la subunidad $\alpha$ unida al GTP activa como el complejo $\beta\gamma$, interaccionan con sus dianas para dar lugar a una respuesta intracelular. La subunidad $\alpha$ se inactiva por la hidrólisis del GTP unido a ella, de tal manera que la subunidad $\alpha$ inactiva (ahora unida al GDP) se reasocia con el complejo $\beta\gamma$, quedando así listo para el comienzo de un nuevo ciclo.

El genoma de los mamíferos codifica, al menos, 20 subunidades $\alpha$ diferentes, 6 subunidades $\beta$ y 11 subunidades $\gamma$. Proteínas G distintas se asocian con receptores distintos, de tal manera que esta panoplia de proteínas G acopla los receptores a diferentes dianas intracelulares. Por ejemplo, la proteína G asociada al receptor de la epinefrina se denomina $G_s$ porque su subunidad $\alpha$ estimula a la adenilato ciclasa (véase Fig. 13.11). Las subunidades $\alpha$ y $\beta\gamma$ de otras proteínas G actúan, sin embargo, inhibiendo a la adenilato ciclasa o regulando la actividad de otras enzimas diana.

Además de regular enzimas diana, tanto la subunidad $\alpha$ como las $\beta\gamma$ de algunas proteínas G regulan directamente canales iónicos. Un buen ejemplo lo proporciona el efecto del neurotransmisor acetilcolina en el músculo cardíaco, que es diferente al ejercido en los nervios o en el músculo esquelético. El receptor de la acetilcolina en las células nerviosas o del músculo esquelético es un canal iónico regulado por ligando (véase Fig. 12.23). Las células del músculo cardíaco tienen un receptor de acetilcolina diferente, asociado a proteína G. Esta proteína G se denomina $G_i$ porque su subunidad $\alpha$ *i*nhibe a la adenilato ciclasa. Además, las subunidades $\beta$ y $\gamma$ de $G_i$ actúan directamente sobre los canales de $K^+$ de la membrana plasmática causando su apertura, dando como resultado una contracción más lenta del músculo cardíaco.

### *Receptores proteína-tirosina quinasa*

A diferencia de los receptores asociados a proteínas G, otros receptores de la superficie celular se encuentran directamente acoplados a enzimas intracelulares. La familia más grande de estos receptores acoplados a enzimas son los **receptores proteína-tirosina quinasas**, los cuales fosforilan las proteínas sustrato en los residuos de tirosina. Esta familia incluye a los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos, por lo que la fosforilación de las tirosinas de las proteínas han sido estudiadas fundamentalmente como un mecanismo de señalización involucrado en el control del crecimiento y de la diferenciación de las células animales. Así, la primera proteína-tirosina quinasa fue descubierta en 1980 por Tony Hunter y Bartholomew Sefton al estudiar las proteínas oncogénicas de los virus causantes de tumores en animales, concretamente el virus del sarcoma de Rous. Igualmente, Stanley Cohen y col. encontraron que el receptor del EGF actuaba como una proteína-tirosina quinasa, estableciéndo así que la fosforilación de las tirosinas de la proteína era un mecanismo de señalización esencial en la respuesta celular a la estimulación por factores de crecimiento.

El genoma codifica 58 receptores proteína-tirosina quinasas, incluyendo los receptores para el EGF, NGF, PDGF, la insulina y muchos otros factores de crecimiento. Estos receptores comparten una estructura común: un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice $\alpha$ transmembrana, y un dominio citosólico C- terminal con actividad proteína-tirosina quinasa (Fig. 13.13). La mayoría de los receptores proteína-tirosina quinasas están constituidos por un único polipéptido, pero el receptor de la insulina y otros receptores relacionados son dímeros constituidos por dos pares de cadenas polipeptídicas. La unión del ligando (p. ej., un factor de crecimiento) al dominio extracelular de estos receptores activa el dominio quinasa citosólico, dando lugar a la fosforilación del propio receptor y de las proteínas diana intracelulares, que propagan la señal iniciada por la unión del factor de crecimiento.

El primer paso del proceso de señalización en la mayoría de los receptores proteína-tirosina quinasas es la dimerización del receptor inducida por ligando

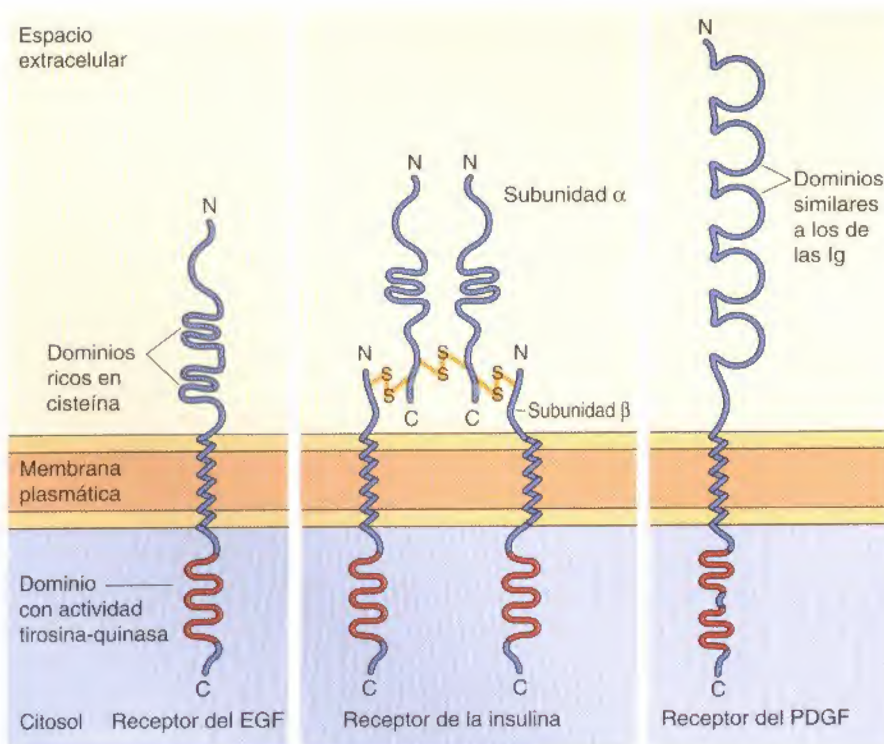
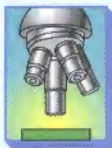



*Figura 13.13*
**Organización de los receptores proteína-tirosina quinasas.** Cada receptor está constituido por un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una única hélice $\alpha$ transmembrana y un domino citosólico C-terminal con actividad proteína-tirosina quinasa. Se muestra la estructura de tres subfamilias distintas de receptores proteína-tirosina quinasas. Tanto el receptor del EGF como el receptor de la insulina tienen dominios extracelulares ricos en cisteína, mientras que el receptor del PDGF tiene dominios semejantes a los de las inmunoglobulinas (Ig). Del receptor del PDGF, merece la pena señalar que su dominio quinasa está interrumpido por un inserto de unos cien aminoácidos que no están relacionados con los aminoácidos habitualmente encontrados en los dominios catalíticos de las proteína-tirosina quinasas. La peculiaridad del receptor de insulina es que es un dímero constituido por dos pares de cadenas polipeptídicas (denominadas $\alpha$ y $\beta$).



## Experimento clave

# *Proteína-tirosina quinasa Src*

**El producto génico transformante del virus del sarcoma de Rous fosforila a la tirosina**
Tony Hunter y Bartholomew Sefton
The Salk Institute, San Diego, CA
*Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1980, Vol. 77, págs. 1311-1315*

## Contexto

Tras ser aislado en 1911, el virus del sarcoma de Rous (RSV) fue el primer virus al que se consideró como causante de tumores en animales (véase el cuadro Medicina Molecular en el Cap. 1). Varias de sus características hicieron de él un modelo interesante para estudiar el desarrollo del cáncer. En particular, el pequeño tamaño del genoma del RSV ofrecía la esperanza de poder identificar aquellos genes responsables de inducir la proliferación anormal característica de las células cancerosas. Este objetivo se alcanzó en los años 70 cuando se estableció que se requiere un único gen del RSV (al que se le denominó *src* de *sarc*oma) para la inducción de tumores. De igual importancia fue el descubrimiento de un gen íntimamente relacionado con *src* en la dotación génica normal de varios vertebrados, entre ellos el hombre. Puesto que la proteína viral Src era la causante de la proliferación incontrolada de las células cancerosas, la comprensión del funcionamiento de Src permitiría vislumbrar las bases moleculares tanto de la inducción del cáncer como de la regulación de la proliferación en las células sanas.

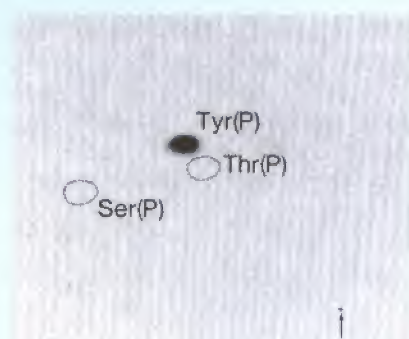
En 1977, Ray Erikson y col. identificaron la proteína Src mediante inmunoprecipitación (véase Fig. 3.32) con antisuero de animales afectados por tumores inducidos por el RSV. A partir de aquí, se descubrió que la incubación de inmunoprecipitados de Src con ATP radiactivo daba como resultado la fosforilación de las moléculas de inmunoglobulina. Por tanto, la proteína Src parecía ser una proteína quinasa, lo que relacionaba la fosforilación de proteínas con el control de la proliferación celular.

Todas las proteína quinasas estudiadas anteriormente fosforilaban residuos de serina o treonina, los cuales eran los únicos fosfoaminoácidos detectados en las células animales. Sin embargo, Walter Eckhardt y Tony Hunter habían observado en 1979 que la proteína oncogénica de otro virus tumoral animal (el poliomavirus) era fosforilada en un residuo de tirosina. Así, Hunter y Sefton comprobaron la posibilidad de que Src fosforilara restos de tirosina en vez de restos de treonina o de serina en sus proteínas sustrato. Sus experimentos demostraron que Src actúa con función proteína-tirosina quinasa —una actividad que actualmente se considera que desempeña un papel fundamental en las vías de señalización celular.

## Experimentos

Hunter y Sefton identificaron el aminoácido fosforilado por Src mediante la incubación de inmunoprecipitados de Src con ATP marcado con $^{32}P$. El aminoácido que fuera fosforilado en la proteína sustrato (en este caso la inmunoglobulina) quedaría marcado con radiactividad. La inmunoglobulina fue purificada e hidrolizada para dar lugar a los aminoácidos individuales, los cuales se analizaron mediante cromatografía y electroforesis obteniéndose la separación de la fosfotirosina, la fosfotreonina y la fosfoserina (véase Figura). El aminoácido radiactivo detectado en estos experimentos fue la fosfotirosina, lo que indicaba que Src fosforilaba específicamente residuos de tirosina.

Experimentos posteriores mostraron que la proteína Src de las células sanas, al igual que Src de origen viral, también actuaba como una proteína-tirosina quinasa en ensayos de inmunoprecipitación. Además, Hunter y Sefton ampliaron estos experimentos in vitro demostrando la presencia de fosfotirosina en proteínas extraídas de células enteras. En las células sanas, la fosfotirosina sólo era el 0,03 % de los fosfoaminoácidos totales (el resto eran fosfoserina y fosfotreonina), lo que explicaba por qué no había sido detectada. Sin embargo, la fosfotirosina era aproximadamente diez veces más abundante en las células que habían sido infectadas con el RSV, lo que sugería que la mayor actividad proteína-tirosina quinasa de la proteína viral Src era la responsable de la inducción de la proliferación celular anormal.




Identificación de fosfotirosina en inmunoglobulinas fosforiladas por Src. Un inmunoprecipitado que contenía Src procedente del RSV se incubó con [$^{32}P$]-ATP. La inmunoglobulina se purificó y se hidrolizó. Los aminoácidos del hidrolizado se separaron mediante electroforesis y cromatografía en una placa de celulosa de capa fina. La posición de los aminoácidos marcados con $^{32}P$ se determinó mediante la exposición de la placa a una película de rayos X. Las líneas discontinuas indican las posiciones de los fosfoaminoácidos no marcados que se incluyeron como marcadores. Cabe destacar que el aminoácido principal marcado con $^{32}P$ es fosfotirosina.

## *Proteína-tirosina quinasa Src* (continuación)

### Impacto

El descubrimiento de que Src era una proteína-tirosina quinasa, supuso la identificación de una nueva actividad proteína quinasa y que ésta estaba relacionada con el control de la proliferación celular. A los resultados de Hunter y Sefton siguieron otros que demostraban que muchas otras proteínas tumorales de virus también actuaban como proteína-tirosina quinasas, lo que supuso la generalización del vínculo entre la fosforilación de las proteína-tirosinas y la proliferación anormal de las células cancerosas. Más aun, Stanley Cohen y col. encontraron que el receptor del EGF es una proteína-tirosina quinasa, lo que implicaba directamente a la fosforilación de proteína-tirosinas en el control de la proliferación de células normales. Estudios posteriores han identificado numerosos receptores proteína-tirosina quinasas y proteína-tirosina quinasas no receptoras que intervienen en multitud de vías de señalización celular. Así, la investigación acerca del mecanismo por el que un virus provocaba cáncer en pollos dio lugar al descubrimiento de una actividad enzimática desconocida hasta ese momento, la cual desempeña un papel central en las vías de señalización que regulan el crecimiento y la diferenciación de las células animales.


Tohy Hunter


Bartholomew Sefton

(Fig. 13.14). Algunos factores de crecimiento, como el PDGF o el NGF, son dímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas idénticas; estos factores de crecimiento inducen la polimerización a través de la unión simultánea a dos moléculas diferentes de receptor. Otros factores de crecimiento (como el EGF) son monómeros pero desencadenan la dimerización de receptores como resultado de la inducción de cambios conformacionales que facilitan las interacciones proteína-proteína entre los polipéptidos de los receptores.

La dimerización inducida por ligando conduce a la **autofosforilación** del receptor ya que las cadenas polipeptídicas del dímero se fosforilan la una a la otra de manera cruzada (véase Fig. 13.14). La autofosforilación desempeña dos papeles fundamentales en la señalización a través de estos receptores. En primer lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio catalítico es un mecanismo de regulación ya que incrementa la actividad proteína quinasa del receptor. En segundo lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina que no pertenecen al dominio catalítico supone la generación de sitios de unión

*Figura 13.14*
**Dimerización y autofosforilación de los receptores proteína-tirosina quinasas.** La unión del factor de crecimiento induce la dimerización del receptor, lo que da lugar a la autofosforilación del mismo ya que las dos cadenas polipeptídicas se fosforilan mutuamente.

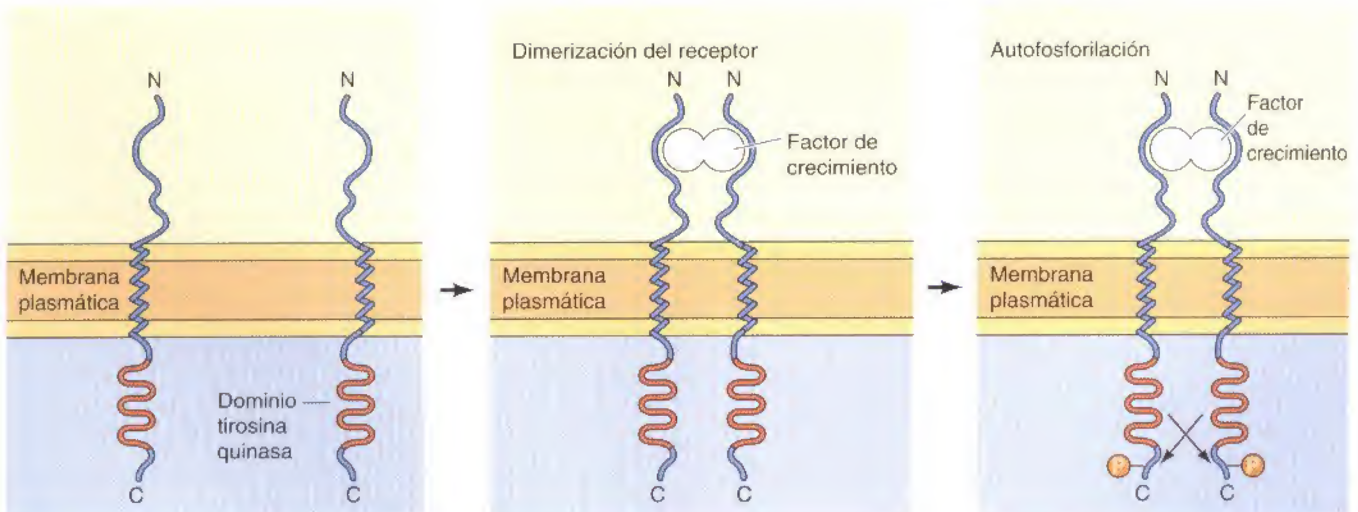
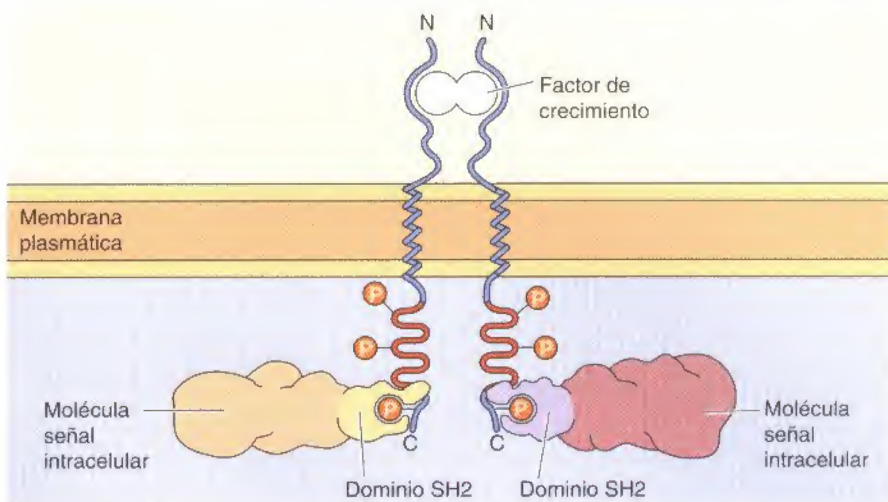


*Figura 13.15*
**Asociación de moléculas señal intracelulares con los receptores proteína-tirosina quinasas.** Los dominios SH2 se unen a péptidos específicos que contengan fosfotirosina, de los receptores activados.




específicos para otras proteínas, a través de las que se transmitirá la señal al interior celular desde los receptores activados.

La asociación de estas moléculas señal intracelulares con los receptores proteína-tirosina quinasas, se lleva a cabo a través de un dominio de la proteína que se une a péptidos específicos del receptor que contengan fosfotirosinas (Fig. 13.15). De estos dominios, los mejor conocidos se denominan **dominios SH2** (de *h*omología *2* con *S*rc), ya que fueron identificados por primera vez en las proteína-tirosina quinasas relacionadas con Src, la proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous. Los dominios SH2 se componen de cien aminoácidos aproximadamente, y se unen a cortas secuencias peptídicas específicas que contengan residuos de fosfotirosina (Fig. 13.16). Otras proteínas se unen a los péptidos que contienen residuos de fosfotirosina mediante los **dominios PTB** (del inglés *p*hosphotyrosine *b*inding). La asociación de las proteínas con dominios SH2, con los receptores proteína-tirosina quinasas activados tiene varios efectos: sitúa a las proteínas con dominios SH2 junto a la membrana plasmática, permite su interacción con otras proteínas, promueve su fosforilación y estimula su actividad enzimática. Por lo tanto, la asociación de estas proteínas con los receptores autofosforilados supone el primer paso en la transmisión intracelular de señales, que comenzó con la unión de los factores de crecimiento a la superficie celular.

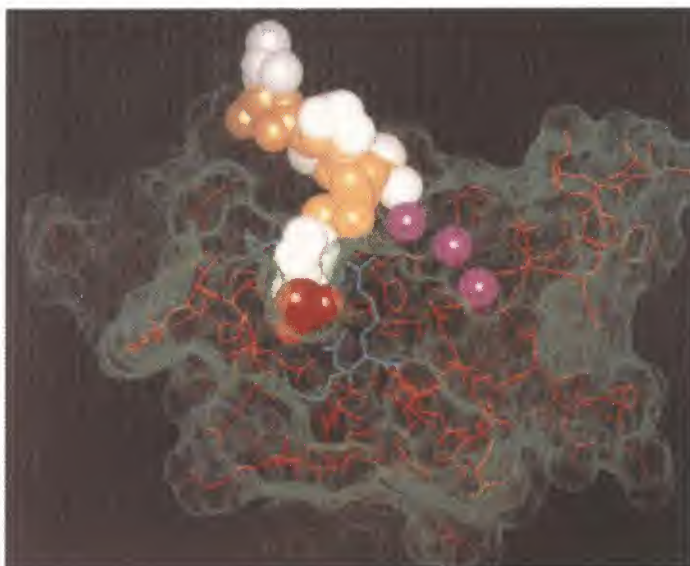


*Figura 13.16*
**Complejo constituido por un dominio SH2 y un péptido con fosfotirosina.** La cadena polipeptídica del dominio SH2 de la Src se muestra en color rojo y su superficie se indica con el punteado verde. Las bolas moradas muestran un surco en la superficie. Los tres residuos aminoacídicos que interaccionan con la fosfotirosina aparecen en azul. El péptido con fosfotirosina se ha representado por un modelo tridimensional de espacio lleno. Las bolas amarillas y blancas indican, respectivamente, los átomos del esqueleto y de las cadenas laterales, y el grupo fosfato aparece en rojo. (A partir de G. Waksman et al., 1992. *Nature* 358:646.)

### *Receptores de citoquinas y proteína-tirosina quinasas no receptoras*

Muchos receptores, en vez de tener ellos mismos la actividad proteína-tirosina quinasa, actúan estimulando a proteína-tirosina quinasas a las que no están unidas covalentemente. Esta familia de receptores (denominada la **superfamilia de receptores de citoquinas**) incluye a los receptores de la mayoría de las citoquinas (p. ej., la interleuquina-2 y la eritropoyetina) y a los receptores de algunas hormonas polipeptídicas (p. ej., la hormona del crecimiento). Al igual que los receptores proteína-tirosina quinasas, éstos están constituidos por un dominio N-terminal, extracelular, de unión a ligando, una única hélice $\alpha$ transmembrana, y un dominio C-terminal citosólico. Sin embargo, el dominio citosólico de los receptores de citoquinas carece de actividad catalítica conocida. En vez de esto, los receptores de citoquinas actúan en asociación con **proteína-tirosina quinasas no receptoras**, las cuales son activadas por la unión del ligando al receptor.

Se piensa que el primer paso de la señalización a partir del receptor de citoquinas, es la dimerización del receptor inducida por ligando y la fosforilación cruzada de las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas (Fig. 13.17). Estas quinasas activadas fosforilarán al receptor, lo que proporcionará sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares que tengan dominios SH2. Por lo tanto, la combinación de los receptores de citoquinas más las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas, funciona de la misma manera que lo hacen los receptores con actividad proteína-tirosina quinasa tratados en la sección anterior.

Las quinasas asociadas con los receptores de citoquinas pertenecen a la familia de las **quinasas Janus**, o **JAK**, formada por cuatro proteína-tirosina quinasas no receptoras relacionadas. Los miembros de la familia JAK parecen ser universalmente necesarios para la señalización a través de receptores de citoquinas, lo que indica que las quinasas de la familia JAK juegan un papel crítico en el acoplamiento de estos receptores a la fosforilación en tirosinas de dianas intracelulares.

Las proteína-tirosina quinasas no receptoras adicionales pertenecen a la familia **Src**, que está formada por Src y ocho proteínas estrechamente relacionadas. Como ya se ha indicado, Src fue inicialmente identificada como una proteína oncogénica del virus del sarcoma de Rous, y fue la primera proteína en la que se demostró la actividad proteína-tirosina quinasa, de modo que ha jugado un papel clave en los experimentos que han llevado a nuestra comprensión actual de la señalización celular. Los miembros de la familia Src juegan papeles clave en la señalización desencadenada por los receptores proteína-tirosina quinasa, desde los receptores de antígeno en los linfocitos B y T, y (como se estudiará más adelante en este capítulo) desde la integrinas en los puntos de adhesión celular a la matriz extracelular.

### *Receptores asociados a otras actividades enzimáticas*

Aunque la gran mayoría de los receptores asociados a enzimas estimulan la fosforilación de proteína-tirosinas, algunos receptores se encuentran asociados a otras actividades enzimáticas. Estos receptores incluyen proteína-tirosina fosfatasas, proteína-serina/treonina quinasas y guanilato ciclasas.

Las **proteína-tirosina fosfatasas** quitan grupos fosfato de los residuos de fosfotirosina, actuando de manera opuesta a las proteína-tirosina quinasas. En muchos casos, las proteína-tirosina fosfatasas actúan como reguladores nega-

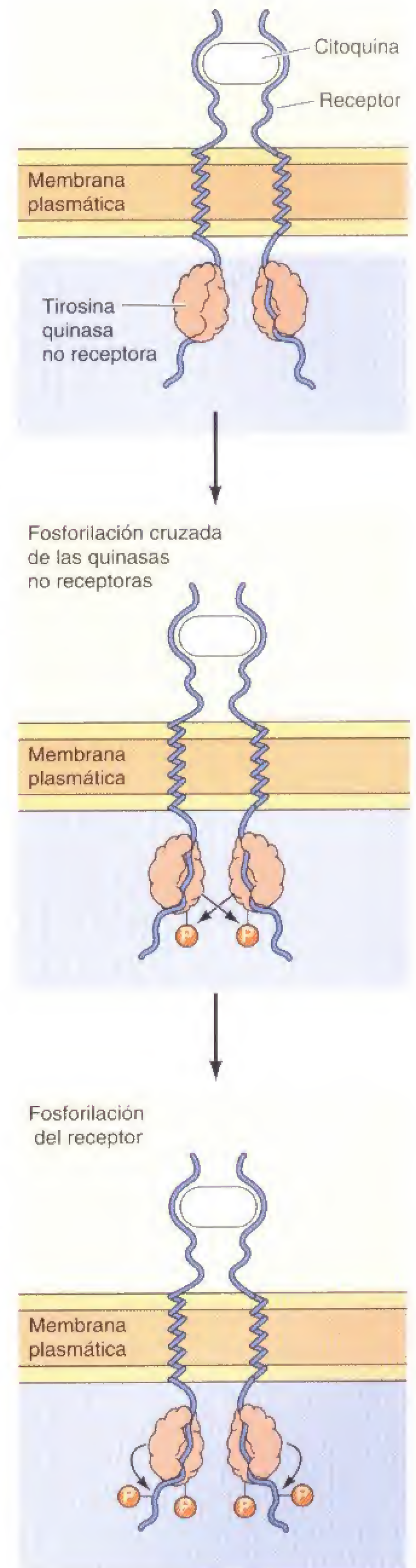



*Figura 13.17*
**Señalización a partir del receptor de citoquinas.** La unión del ligando induce la dimerización de los receptores, y conduce a la activación de las proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas debido a una fosforilación cruzada. Seguidamente, las quinasas activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor, dando lugar a sitios de unión de fosfotirosina para las moléculas señal intracelulares.

tivos en las vías de señalización celular, ya que se encargan de interrumpir las señales que se activaron a partir de la fosforilación de las proteína-tirosinas. Sin embargo, algunas proteína-tirosina fosfatasas son receptores de superficie celular cuya actividad enzimática es un mecanismo de regulación positiva en la señalización celular. Un buen ejemplo de esto último lo proporciona el receptor denominado CD45, que se expresa en la superficie de los linfocitos B y T. Tras la estimulación por el antígeno, parece ser que el CD45 desfosforila una fosfotirosina específica, la cual inhibe la actividad enzimática de miembros de la familia Src. Por tanto, la función de la proteína-tirosina fosfatasa CD45 es, paradójicamente, la de activar proteína-tirosina quinasas no receptoras.

Los receptores para el **factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF-$\beta$)** y otros polipéptidos relacionados, son proteína quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina de sus proteínas sustrato, en vez de restos de tirosina. El TGF-$\beta$ es el prototipo de una familia de factores de crecimiento polipeptídicos que controlan la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares, generalmente inhibiendo la proliferación de sus células diana. La clonación del primer receptor para un miembro de la familia de los TGF-$\beta$, puso de manifiesto que es el modelo de una familia específica de receptores con un dominio **proteína-serina/treonina quinasa**. Desde entonces, los receptores encontrados para otros miembros de la familia de los TGF-$\beta$ también han resultado ser proteína-serina/treonina quinasas. La unión del ligando a estos receptores provoca la asociación de dos cadenas polipeptídicas distintas, codificadas por miembros distintos de la familia de los receptores de TGF-$\beta$, dando lugar a heterodímeros en los que los receptores con actividad quinasa se fosforilan mutuamente de manera cruzada. Entonces, los receptores de TGF-$\beta$ activados fosforilan a los miembros de una familia de factores de transcripción denominados SMADs, los cuales se translocan al núcleo y activan la expresión de los genes diana.

Algunos ligandos peptídicos se unen a receptores cuyos dominios citosólicos tienen actividad guanilato ciclasa, catalizando la formación de GMP cíclico. Como ya se dijo anteriormente, el óxido nítrico también activa la guanilato ciclasa, pero la diana del óxido nítrico es una enzima intracelular en vez de un receptor transmembrana. Los receptores **guanilato ciclasa** tienen un dominio extracelular de unión al ligando, una única hélice $\alpha$ transmembrana, y un dominio citosólico con actividad catalítica. La unión al ligando estimula la actividad catalítica, dando lugar a la formación de GMP cíclico —un segundo mensajero cuyos efectos en el interior de la célula se discutirán en la próxima sección de este capítulo.

Otros receptores se unen a proteínas citoplasmáticas con actividad bioquímica diferente. Por ejemplo, la citoquina factor de necrosis tumoral (TNF) induce la muerte celular, quizás (como se verá posteriormente en este capítulo) como un mecanismo de eliminar de los tejidos células excedentes o deterioradas. Los receptores del TNF y de otras moléculas relacionadas, señalizadoras de muerte celular, se asocian a proteasas específicas, que son activadas en respuesta a la unión del ligando. La activación de estas proteasas asociadas a receptor dispara la activación de proteasas posteriores, lo que lleva, en última instancia, a la degradación de varios tipos de proteínas intracelulares y a la muerte de la célula.

## Vías de transducción intracelular de señales

La mayoría de los receptores de superficie celular activan enzimas diana intracelulares, las cuales pueden estar, bien unidas directamente a los receptores, o bien asociadas a ellos a través de proteínas G. Estas enzimas intracelulares sirven como elementos que transmiten la señal hacia lugares posteriores en el interior celular, propagando y amplificando la señal iniciada por la unión del ligando. En la mayoría de los casos, una cascada de reacciones transmite la señal desde la superficie celular hasta diversas dianas intracelulares - un proce-

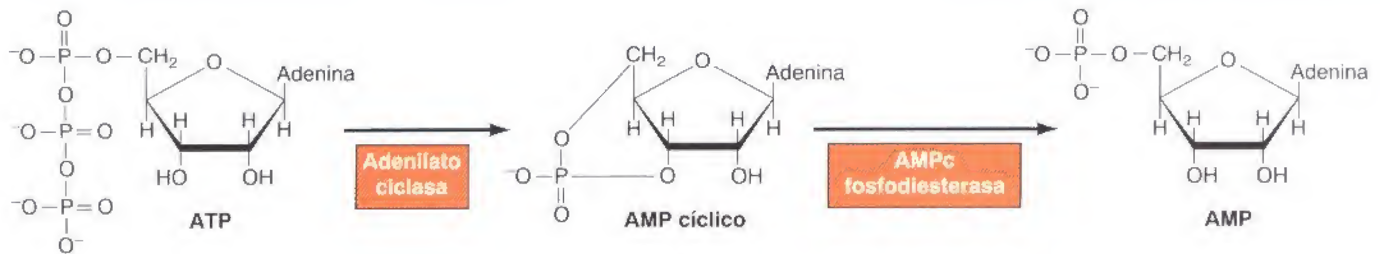



*Figura 13.18*
**Síntesis y degradación del AMPc.** El AMP cíclico se sintetiza a partir del ATP por la adenilato ciclasa y es degradado a AMP por la AMPc fosfodiesterasa.

so denominado **transducción intracelular de señales**. Las dianas de estas vías de señalización suelen ser factores de transcripción cuya función es regular la transcripción génica. Por tanto, los mecanismos de señalización intracelular conectan la superficie celular con el núcleo, dando lugar a variaciones en la expresión génica como respuesta a los estímulos extracelulares.

### *Vía del AMPc: segundos mensajeros y fosforilación de proteínas*

La señalización intracelular se puso de manifiesto por primera vez al estudiar la acción de hormonas tales como la epinefrina, que causa la hidrólisis del glucógeno a glucosa previa a la actividad muscular. En 1958, Earl Sutherland descubrió que la acción de la epinefrina era mediada por un aumento en la concentración intracelular de **AMP cíclico (AMPc)**, lo que llevó a la idea de que el AMPc es un **segundo mensajero** de la señalización hormonal (siendo la hormona el primer mensajero). El AMPc se forma a partir del ATP por la acción de la **adenilato ciclasa** y es degradado a AMP por la **AMPc fosfodiesterasa** (Fig. 13.18). Como ya se señaló anteriormente, el receptor de la epinefrina está asociado a la adenilato ciclasa vía una proteína G que estimula su actividad enzimática, dando lugar al aumento de la concentración intracelular de AMPc (véase Fig. 13.11).

Entonces, ¿cómo señaliza el AMPc la rotura del glucógeno? Éste y la mayoría de los efectos del AMPc en la célula animal son mediados por la acción de la **proteína quinasa dependiente de AMPc** o **proteína quinasa A**, una enzima descubierta por Donald Walsh y Ed Krebs en 1968. La forma inactiva de la proteína quinasa A es un tetrámero constituido por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras (Fig. 13.19). El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras provocando su disociación de las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas libres son enzimáticamente activas y son capaces de fosforilar residuos de serina de sus proteínas diana.

En la regulación del metabolismo del glucógeno, la proteína quinasa A fosforila a dos proteínas diana (Fig. 13.20). La primera es otra proteína quinasa, la fosforilasa quinasa, que es fosforilada y activada por la proteína quinasa A. La fosforilasa quinasa, a su vez, fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa, que cataliza la rotura del glucógeno a glucosa-1-fosfato. Además, la proteína quinasa A fosforila la enzima glucógeno sintetasa, que cataliza la síntesis de glucógeno. En este caso, la fosforilación inhibe la actividad enzimática. Por lo tanto, el incremento del AMPc y la activación de la proteína quinasa A bloquea la síntesis de glucógeno a la vez que activa su hidrólisis.

La cadena de reacciones que conduce desde el receptor de la epinefrina hasta la glucógeno fosforilasa proporciona un buen ejemplo de la amplificación de la

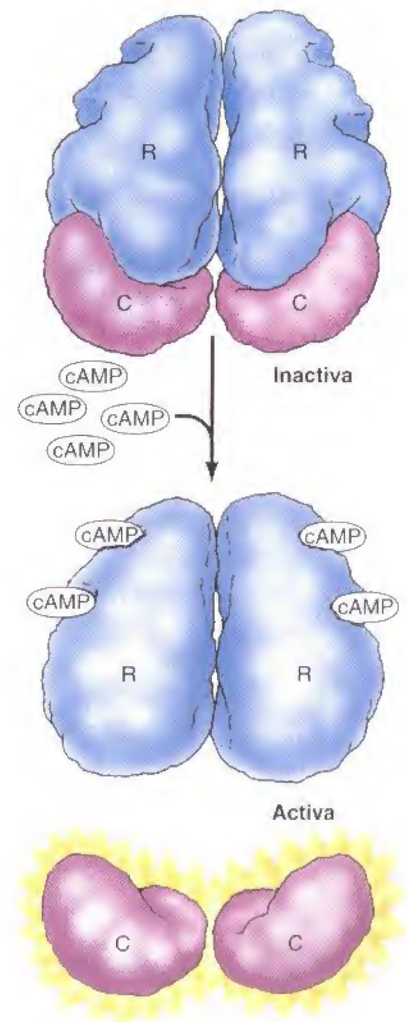



*Figura 13.19*
**Regulación de la proteína quinasa A.** La forma inactiva de la proteína quinasa A está constituida por dos subunidades reguladoras (R) y por dos subunidades catalíticas (C). La unión del AMPc a las subunidades reguladoras induce un cambio conformacional que lleva a la disociación de las subunidades catalíticas, de lo que resulta la activación enzimática de éstas.

*Figura 13.20*
**Regulación del metabolismo del glucógeno por la proteína quinasa A.** La proteína quinasa A fosforila a la glucógeno sintetasa y a la fosforilasa quinasa. Esta fosforilación inhibe a la glucógeno sintetasa (que cataliza la síntesis de glucógeno), mientras que activa a la fosforilasa quinasa. Entonces, la fosforilasa quinasa fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa, que cataliza la rotura del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

señal durante la transducción de señales intracelular. Cada molécula de epinefrina activa un único receptor. Sin embargo, cada receptor puede activar hasta cien moléculas de $G_s$. Cada molécula de $G_s$ activa a la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis de muchas moléculas de AMPc. La señal continúa amplificándose puesto que cada molécula de proteína quinasa A fosforila muchas moléculas de fosforilasa quinasa, que, a su vez, fosforilan muchas moléculas de glucógeno fosforilasa. Por lo tanto, la unión de la hormona a un pequeño número de receptores da lugar a la activación de un número mucho mayor de enzimas diana intracelulares.

En muchas células animales, el aumento del AMPc activa la transcripción de unos genes diana específicos que contienen una secuencia reguladora denominada **elemento de respuesta a AMPc**, o **CRE** (Fig. 13.21). En este caso, la señal desde el citoplasma al núcleo la lleva la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, que es capaz de entrar en el núcleo tras su desacoplamiento de la subunidad reguladora. En el núcleo, la proteína quinasa A fosforila a un factor de transcripción denominado **CREB** (de proteína de unión a CRE), lo que activa los genes inducidos por AMPc. Este tipo de regulación de la expresión génica por el AMPc desempeña un papel importante en el control de la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de diversos tipos de células animales.

Es importante señalar que las proteína quinasas, como la proteína quinasa A, no actúan de manera aislada en la célula. Por el contrario, la fosforilación de las proteínas es revertida rápidamente por la acción de las proteína fosfatasas. Algunas proteína fosfatasas son receptores de membrana, como se dijo en la sección anterior. Otras son enzimas citosólicas que quitan grupos fosfato de restos fosforilados de tirosina o de serina/treonina de sus proteínas sustrato. Estas proteína fosfatasas sirven para finalizar la respuesta iniciada por la activación de las proteína quinasas mediada por receptor. Por ejemplo, los residuos de serina de las proteínas fosforilados por la proteína quinasa A, suelen

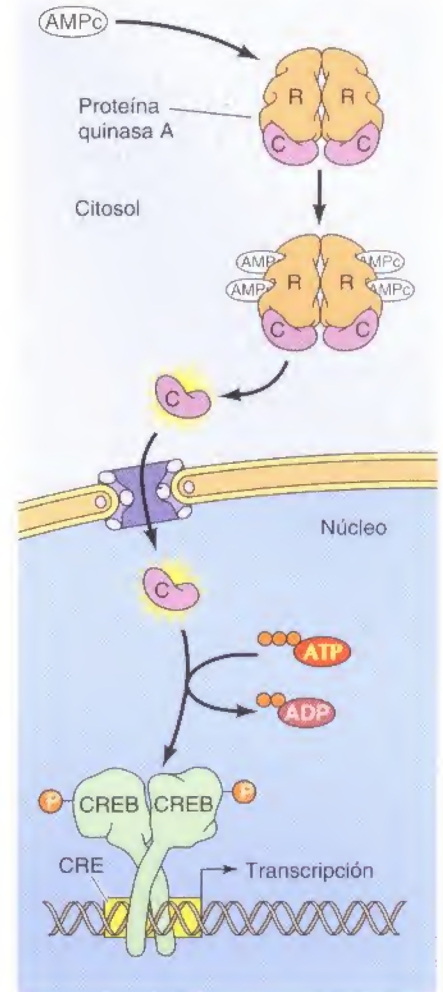



*Figura 13.21*
**Expresión de los genes inducidos por AMPc.** La subunidad catalítica libre de la proteína quinasa A se transloca al núcleo y fosforila al factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE), lo que conduce a la expresión de los genes inducidos por AMPc.

ser desfosforilados por la acción de una fosfatasa denominada proteína fosfatasa 1 (Fig. 13.22). Por lo tanto, el grado de fosforilación que presentan los sustratos de la proteína quinasa A (como la fosforilasa quinasa y el CREB) depende del equilibrio entre la actividad intracelular de la proteína quinasa A y de las proteína fosfatasas.

Aunque la mayor parte de los efectos del AMPc están mediados por la proteína quinasa A, el AMPc también puede regular directamente canales iónicos, independientemente de la fosforilación de las proteínas. El AMP cíclico funciona de esta manera como un segundo mensajero en la detección de olores. Muchos de los receptores de las moléculas olorosas en las neuronas sensoriales de la nariz son receptores asociados a proteínas G que estimulan a la adenilato ciclasa, lo que genera un aumento del AMPc intracelular. En vez de activar a la proteína quinasa A, el AMPc en este sistema provoca la apertura de los canales de $Na^+$ en la membrana plasmática, lo que da lugar a la despolarización de la membrana y a la generación de un impulso nervioso.

## *GMP cíclico*

El **GMP cíclico (GMPc)** también es un segundo mensajero importante en las células animales, aunque su papel no está tan bien caracterizado como el del AMPc. El GMP cíclico se sintetiza a partir del GTP por la guanilato ciclasa y es degradado a GMP por una fosfodiesterasa. Como ya se trató anteriormente en este Capítulo, tanto el óxido nítrico como determinados ligandos peptídicos activan diferentes tipos de guanilato ciclasas. La activación de las guanilato ciclasas aumenta el nivel del GMPc, el cual interviene como mediador de respuestas biológicas, como, por ejemplo, la vasodilatación. El GMPc ejerce su función a través de una proteína quinasa dependiente de GMPc, aunque también puede actuar sobre otras dianas, como por ejemplo canales iónicos.

En el ojo de los vertebrados es donde está mejor caracterizada la acción del GMPc, donde actúa como el segundo mensajero responsable de convertir las señales visuales recibidas en forma de luz en impulsos nerviosos. El fotorreceptor en los bastones de la retina es un receptor asociado a una proteína G denominado **rodopsina** (Fig. 13.23). La rodopsina se activa por la absorción de luz por parte de la pequeña molécula asociada 11-*cis*-retinal, la cual se isomeriza a todo-*trans*-retinal, lo que induce un cambio conformacional en la proteína rodopsina. Entonces, la rodopsina activa a la proteína G **transducina**, y la subunidad $\alpha$ de la transducina activa a la **GMPc fosfodiesterasa**, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc. Esta variación del nivel de GMPc en los bastones se traduce en un impulso nervioso debido a la acción del GMPc sobre los canales

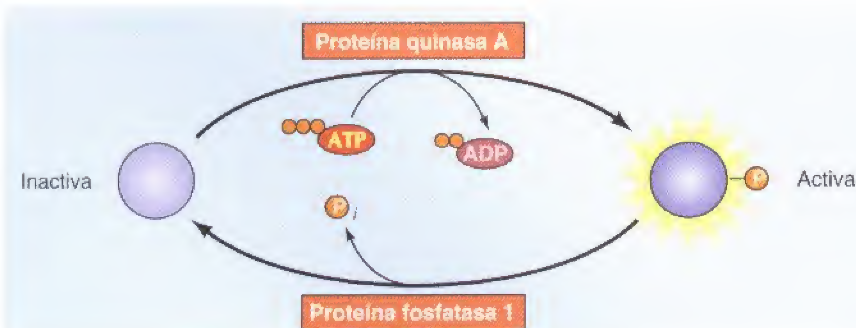



*Figura 13.22*
**Regulación de la fosforilación de proteínas por la proteína quinasa A y por la proteína fosfatasa 1.** La fosforilación de proteínas diana por la proteína quinasa A es revertida por la acción de la proteína fosfatasa 1.

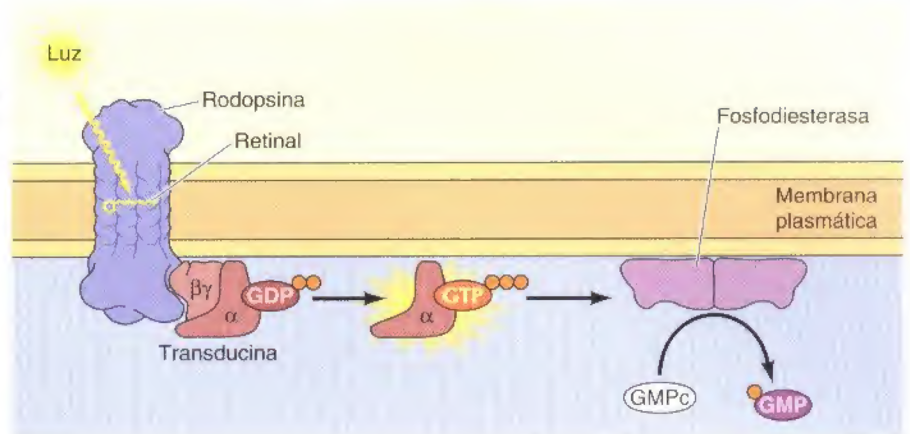



*Figura 13.23*
**Papel del GMPc en la fotorrecepción.** La absorción de luz por parte del retinal activa al receptor asociado a la proteína G rodopsina. Entonces, la subunidad α de la transducina activa a la GMPc fosfodiesterasa, lo que lleva a que disminuya el nivel intracelular de GMPc.

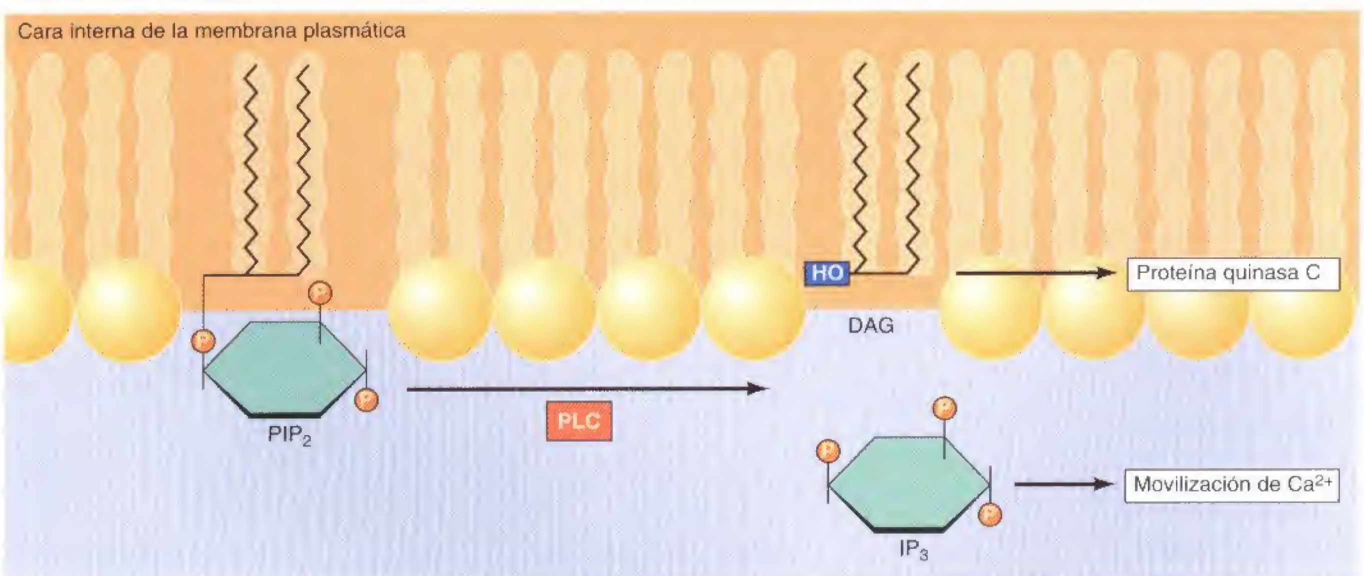
iónicos de la membrana, de manera similar a la acción del AMPc en la detección de los olores.

## *Fosfolípidos y $Ca^{2+}$*

Una de las vías de señalización intracelular más generalizadas se basa en la utilización de segundos mensajeros derivados del fosfolípido de membrana **fosfatidil inositol 4,5-bifosfato ($PIP_2$)**. El $PIP_2$ es un componente minoritario de la membrana plasmática, que se localiza en la cara interna de la bicapa fosfolipídica (véase Fig. 12.2). Diversidad de hormonas y factores de crecimiento inducen la hidrólisis del $PIP_2$ por la **fosfolipasa C** —una reacción que da lugar a dos segundos mensajeros diferentes, el **diacilglicerol** y el **inositol 1,4,5-trifosfato ($IP_3$)** (Fig. 13.24)—. El diacilglicerol y el $IP_3$ activan vías de señalización intracelular diferentes (a la proteína quinasa C y la movilización del $Ca^{2+}$, respectivamente), por lo que la hidrólisis del $PIP_2$ dispara una doble cascada de señales intracelulares.

Hay que destacar que la hidrólisis del $PIP_2$ es activada posteriormente (*downstream*) a los receptores acoplados a las proteínas G y a las proteína-tirosina quinasas. Esto se debe a que una isoforma de la fosfolipasa C (PLC-β) es activada por las proteínas G, mientras que otra (PLC-γ) contiene dominios SH2 responsables de su asociación con receptores proteína-tirosina quinasas

*Figura 13.24*
**Hidrólisis del $PIP_2$.** La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato dando lugar al diacilglicerol (DAG) y al inositol trifosfato ($IP_3$). El diacilglicerol activa a miembros de la familia de la proteína quinasa C, y el $IP_3$ induce la liberación del $Ca^{2+}$ de los reservorios intracelulares.



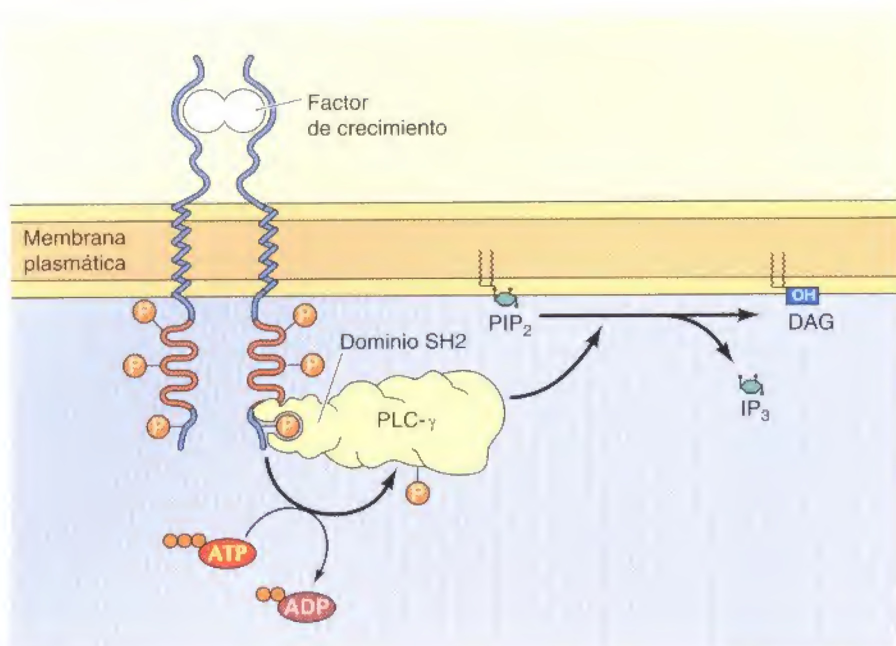



*Figura 13.25*
**Activación de la fosfolipasa C por proteína-tirosina quinasas.** La fosfolipasa C-γ (PLC-γ) se une al receptor proteína-tirosina quinasa activado a través de su dominio SH2. La fosforilación de las tirosinas aumenta la actividad de la PLC-γ, lo que estimula la hidrólisis del $PIP_2$.

activados (Fig. 13.25). Esta interacción es la responsable de la localización de la PLC-χ próxima a la membrana plasmática, así como de la fosforilación de sus tirosinas, lo que aumenta su actividad catalítica.

El diacilglicerol, que se genera por la hidrólisis del $PIP_2$ activa a proteína-serina/treonina quinasas pertenecientes a la familia de la **proteína quinasa C,** muchas de las cuales desempeñan un papel importante en el control del crecimiento y de la diferenciación celular. Un buen ejemplo de este papel de la proteína quinasa C lo proporciona la acción de los **ésteres de forbol** (Fig. 13.26), que han sido muy estudiados porque inducen el desarrollo de tumores en animales. Esta actividad inductora de tumores por parte de los ésteres de forbol se basa en su capacidad para activar la proteína quinasa C, actuando como análogos del diacilglicerol. Entonces, la proteína quinasa C activa otras dianas intracelulares, entre las que se incluye una cascada de proteína quinasas conocida como la vía de las MAP quinasas (que se tratará en detalle en la sección siguiente), que conduce a la fosforilación de factores de transcripción, a variaciones en la expresión génica, y a la estimulación de la proliferación celular.

Mientras que el diacilglicerol permanece asociado a la membrana plasmática, el otro segundo mensajero producido por la ruptura del $PIP_2$, el $IP_3$, es una pequeña molécula polar que es liberada al citosol, donde interviene induciendo la liberación de $Ca^{2+}$ de los reservorios intracelulares (Fig. 13.27). Como se señaló en el Capítulo 12, la concentración de $Ca^{2+}$ se mantiene en niveles extremadamente bajos (aprox. 0,1 $\mu$M) debido a la acción de las bombas de $Ca^{2+}$ que expulsan el $Ca^{2+}$ del interior celular por transporte activo. El $Ca^{2+}$ no sólo se bombea a través de la membrana plasmática, sino también al retículo endoplásmico, sirviendo así, éste, como un reservorio intracelular de $Ca^{2+}$. El $IP_3$ libera el $Ca^{2+}$ del retículo endoplásmico mediante su unión a receptores que son canales de $Ca^{2+}$ regulados por ligando. Debido a esto, los niveles de $Ca^{2+}$ citosólico aumentan hasta cerca de 1 $\mu$M, lo que afecta a la actividad de diversas proteínas diana, incluyendo proteína quinasas y fosfatasas. Por ejemplo, algunos miembros de la familia de la proteína quinasa C requieren $Ca^{2+}$ así como diacil-

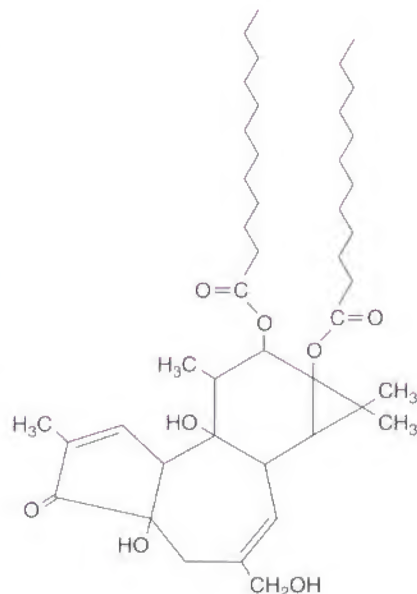



*Figura 13.26*
**Estructura de un éster de forbol.** Los ésteres de forbol activan a la proteína quinasa C actuando como análogos del diacilglicerol.

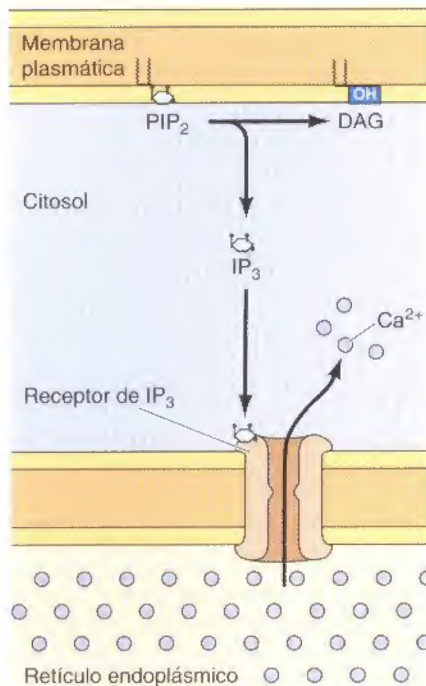



*Figura 13.27*
**Movilización del $Ca^{2+}$ mediada por el $IP_3$.** El $Ca^{2+}$ es bombeado desde el citosol al retículo endoplásmico, el cual sirve como un reservorio de $Ca^{2+}$ intracelular. El $IP_3$ se une a receptores en la membrana del retículo endoplásmico que son canales de $Ca^{2+}$ regulados por ligando, por lo que permite el flujo del $Ca^{2+}$ al citosol.

glicerol para su activación, por lo que estas proteína quinasas son reguladas por ambas ramas de la vía de señalización del $PIP_2$. En la mayoría de las células, el incremento transitorio de $Ca^{2+}$ intracelular resultante de la producción de $IP_3$ desencadena un incremento más mantenido causado por la entrada de $Ca^{2+}$ extracelular a través de canales presentes en la membrana plasmática. Esta entrada de $Ca^{2+}$ del exterior de la célula sirve para prolongar la señal iniciada por la liberación de $Ca^{2+}$ del retículo endoplásmico y para permitir rellenar las reservas de $Ca^{2+}$ del retículo endoplásmico.

Muchos de los efectos del $Ca^{2+}$ están medidos por la proteína de unión del $Ca^{2+}$ **calmodulina**, que se activa por la unión del $Ca^{2+}$ cuando la concentración del $Ca^{2+}$ citosólico aumenta hasta aproximadamente 0,5 $\mu$M (Fig. 13.28). Entonces, la $Ca^{2+}$/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo las proteína quinasas. Un ejemplo de estas proteína quinasas dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina es la quinasa de la cadena ligera de la miosina, que induce la contracción actina-miosina mediante la fosforilación de una de las cadenas ligeras de la miosina (véase Fig. 11.29). Otras proteína quinasas que son activadas por la $Ca^{2+}$/calmodulina incluyen a miembros de la familia de las **quinasas CaM**, que fosforilan a distintos tipos de proteínas, entre las que se incluyen enzimas metabólicas, canales iónicos y factores de transcripción. Una de las formas de quinasa CaM abunda especialmente en el sistema nervioso, donde regula la síntesis y la liberación de neurotransmisores. Además, las quinasas CaM regulan la expresión génica a través de la fosforilación de factores de transcripción. Es interesante señalar que uno de los factores de transcripción fosforilados por la quinasa CaM es el CREB, que (como ya se indicó anteriormente) es fosforilado en el mismo sitio por la proteína quinasa A. Esta fosforilación del CREB ilustra una de las múltiples interacciones entre las vías de señalización del $Ca^{2+}$ y del AMPc. Otros ejemplos serían la regulación de las adenilato ciclasas y de las fosfodiesterasas por la $Ca^{2+}$/calmodulina, la regulación de los canales de $Ca^{2+}$ por el AMPc, y la fosforilación de determinadas proteínas diana tanto por la proteína quinasa A como por quinasas dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina. Por lo tanto, las vías de señalización del $Ca^{2+}$ y del AMPc funcionan de manera coordinada en la regulación de multitud de respuestas celulares.

La entrada de $Ca^{2+}$ extracelular es particularmente importante en las células nerviosas y musculares eléctricamente excitables, en las que los canales de $Ca^{2+}$ regulados por voltaje de la membrana plasmática se abren debido a la despolarización de la membrana (Fig. 13.29). El incremento de $Ca^{2+}$ resultante dispara, a su vez, la liberación de $Ca^{2+}$ de los depósitos intracelulares, mediante la activación de canales de $Ca^{2+}$ diferentes denominados **receptores de rianodina**. En las neuronas, uno de los efectos del aumento del $Ca^{2+}$ intracelular es activar la liberación de los neurotransmisores, por lo que el $Ca^{2+}$ desempeña un papel fundamental en la conversión de señales eléctricas a señales químicas en el sistema nervioso. En las células musculares, el $Ca^{2+}$ se acumula en el retículo sarcoplásmico, de donde se libera a partir de la apertura de los receptores de rianodina en respuesta a la variación en el potencial de membrana. La

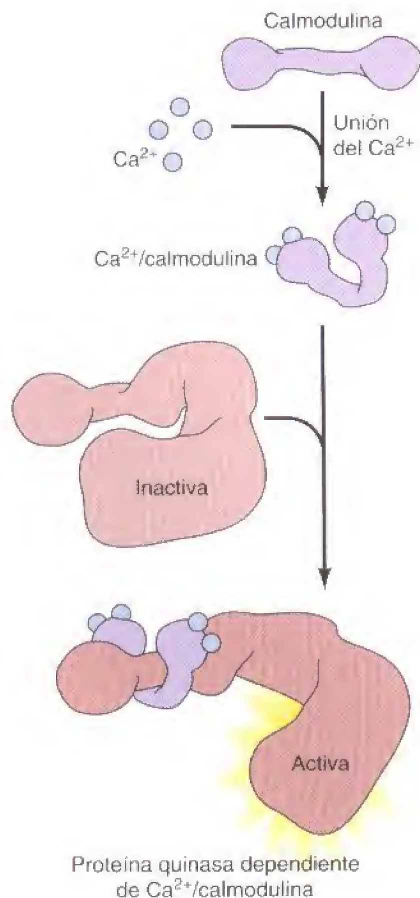



*Figura 13.28*
**Función de la calmodulina.** La calmodulina es una proteína con forma de mancuerna, con cuatro sitios de unión al $Ca^{2+}$. El complejo activo $Ca^{2+}$/calmodulina se une a diversas proteínas diana, incluyendo a proteína quinasas dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina.

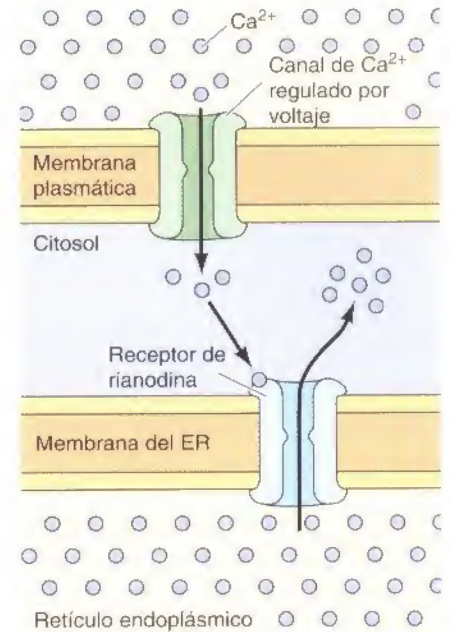



*Figura 13.29*
**Regulación del $Ca^{2+}$ intracelular en las células eléctricamente excitables.** La despolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de $Ca^{2+}$ regulados por voltaje de la membrana plasmática, lo que supone el flujo de $Ca^{2+}$ desde el fluido extracelular. El incremento de $Ca^{2+}$ intracelular resultante activa la ulterior liberación de $Ca^{2+}$ de los depósitos intracelulares mediante la apertura de otros canales de $Ca^{2+}$ diferentes (receptores de rianodina) en la membrana del retículo endoplásmico. En las células musculares, la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico puede tener lugar directamente, en respuesta a la despolarización de la membrana.

liberación del $Ca^{2+}$ acumulado supone un gran incremento del $Ca^{2+}$ citosólico, lo que dispara la contracción muscular (véase Cap. 11). Por lo tanto, las células utilizan diversos mecanismos para regular los niveles de $Ca^{2+}$ intracelular, lo que hace del $Ca^{2+}$ un segundo mensajero muy versátil que controla un amplio rango de procesos celulares.

El $PIP_2$ no sirve solo como una fuente de diacilglicerol y de $IP_3$, sino que también es el punto de partida de una segunda vía diferente de segundos mensajeros que desempeña un papel clave en la regulación de la supervivencia celular. En esta vía, el $PIP_2$ es fosforilado en el sitio 3 del inositol por la enzima **fosfatidilinosítido (PI) 3-quinasa** (Fig. 13.30). Al igual que la fosfolipasa C, una isoforma de la PI 3-quinasa es activada por proteínas G, mientras que una segunda forma tiene dominios SH2 y es activada mediante la asociación a receptores proteína-tirosina quinasas. La fosforilación del $PIP_2$ da lugar al **fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato ($PIP_3$)**, que actúa como un segundo mensajero diferente. Una diana importante del $PIP_3$, que es fundamental en la señalización de la supervivencia celular, es una proteína-serina/treonina quinasa denominada **Akt**. El $PIP_3$ se une a un dominio de la Akt denominado dominio de homología a pleckstrina (Fig. 13.31). Mediante esta interacción, la Akt se sitúa en la cara interna de la membrana plasmática, donde se fosforila y se activa por otras proteína quinasas (denominadas PDKs) que también tienen dominios de homología a pleckstrina y unen $PIP_3$. Por lo tanto, la formación del $PIP_3$ trae como resultado la asociación de Akt y PDKs con la membrana plasmática, lo que lleva a la fosforilación y activación de la Akt. Una vez activada, la Akt fosforila a proteínas diana, entre las que se encuentran proteínas reguladoras de la supervivencia celular, factores de transcripción, y otras proteína quinasas

## *Ras, Raf y vía de las MAP quinasas*

La vía de las MAP quinasas se refiere a una cascada de proteína quinasas que está altamente conservada en la evolución y desempeña un papel central en la transducción de señales en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta el ser humano. Los elementos centrales de esta vía son una familia de proteína-serina/treonina quinasas denominadas **quinasas MAP** (de *p*roteína quinasas *a*ctivadas por *m*itógenos) que se activan en respuesta a diversos factores de crecimiento y a otras moléculas señal. En las levaduras, las vías de las quinasas MAP controlan diversas respuestas celulares, entre las que se incluyen el apareamiento, la forma celular y la esporulación. En los eucariotas superiores (incluyendo *C.elegans*, *Drosophila*, ranas y mamíferos) las quinasas MAP son reguladores ubicuos del crecimiento y de la diferenciación celular.

Las formas mejor caracterizadas de las quinasas MAP en las células de mamíferos pertenecen a la familia de las **ERK** (*q*uinasas *r*eguladas por señales

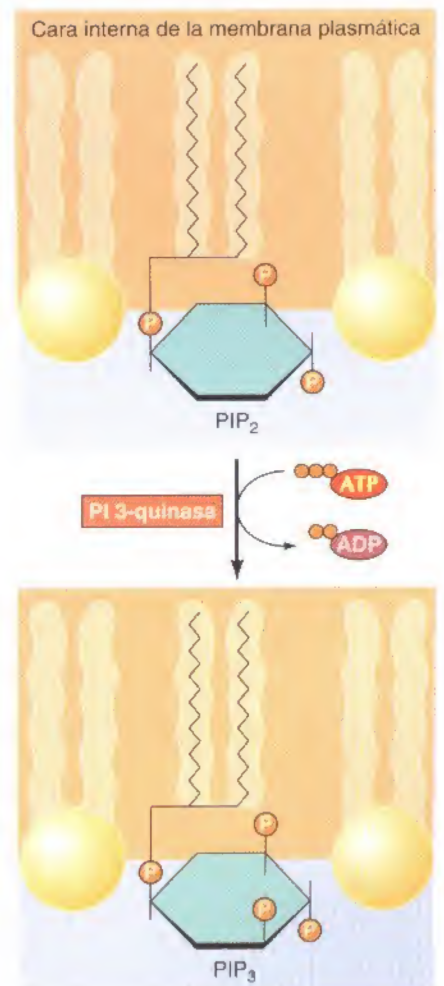



*Figura 13.30*
**Actividad de la PI 3-quinasa.** La PI 3-quinasa fosforila la posición 3 del inositol, convirtiendo el $PIP_2$ en $PIP_3$.

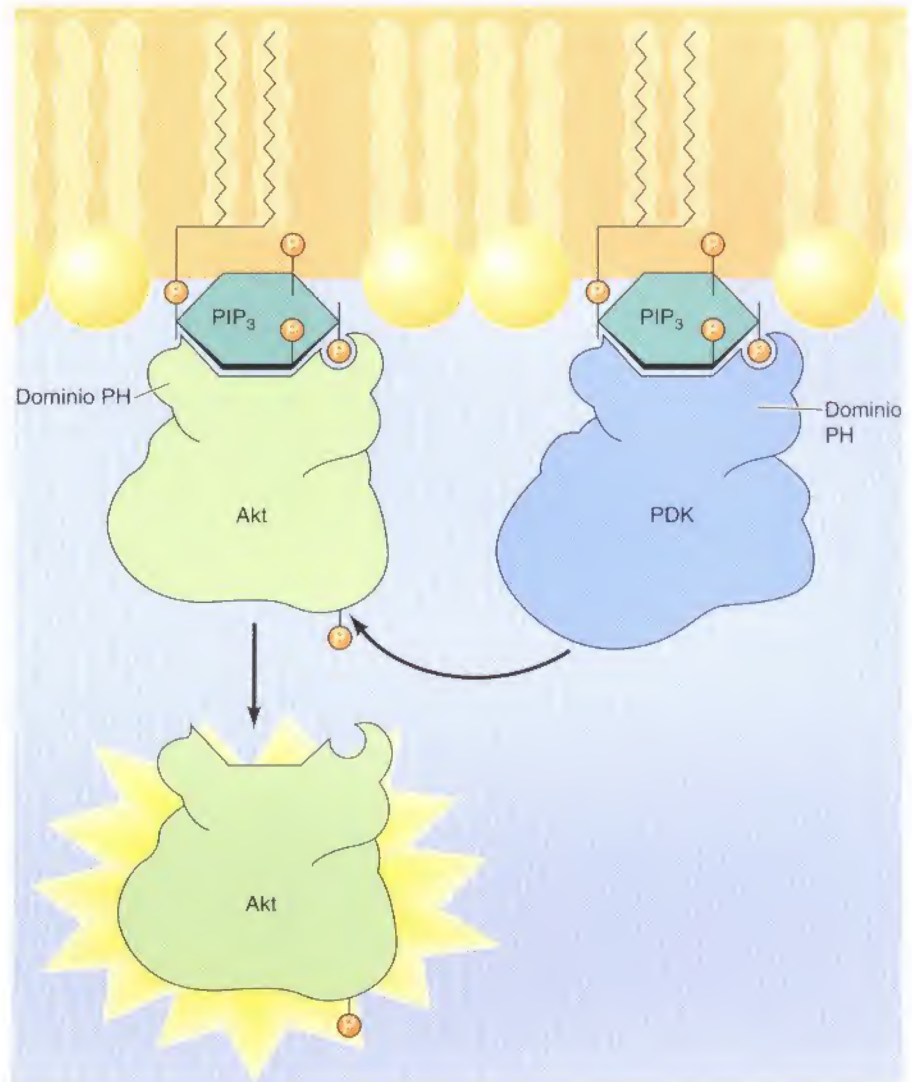



*Figura 13.31*
**Activación de la proteína quinasa Akt.** La Akt se asocia a la membrana plasmática a través de la unión al PIP$_3$ mediante su dominio de homología a pleckstrina (PH). Entonces, es activada debido a la fosforilación por otra proteína quinasa (PDK) que también une PIP$_3$.

extracelulares). La activación de ERK desempeña un papel central en la señalización de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan a través de proteína-tirosina quinasas o de receptores asociados a proteínas G. La proteína quinasa C también puede activar la vía ERK, lo que contribuye a la estimulación de la proliferación celular inducida por los promotores tumorales de ésteres de forbol. Además, tanto la vía del $Ca^{2+}$ como la del AMPc interaccionan con la señalización mediante ERK, bien activando o bien inhibiendo la vía de ERK en función del tipo celular.

La activación de ERK tiene lugar a través de dos proteína quinasas anteriores que están asociadas a receptores de factores de crecimiento mediante una proteína de unión a GTP denominada **Ras** (Fig. 13.32). La activación de Ras provoca la activación de la proteína-serina/treonina quinasa **Raf**, la cual fosforila y activa una segunda proteína quinasa denominada **MEK** (de *M*AP quinasa/*E*RK *q*uinasa). MEK es una proteína quinasa con especificidad doble, que activa a miembros de la familia ERK fosforilando tanto residuos de treonina como de tirosina separados por un aminoácido (p. ej., treonina-183 y tirosina-185 de ERK2). Una vez activada, ERK fosforila diversidad de dianas, incluyendo otras proteína quinasas y factores de transcripción.

El papel central de la vía de la ERK en las células de mamíferos se descubrió a partir de los estudios acerca de las proteínas Ras, que se identificaron por

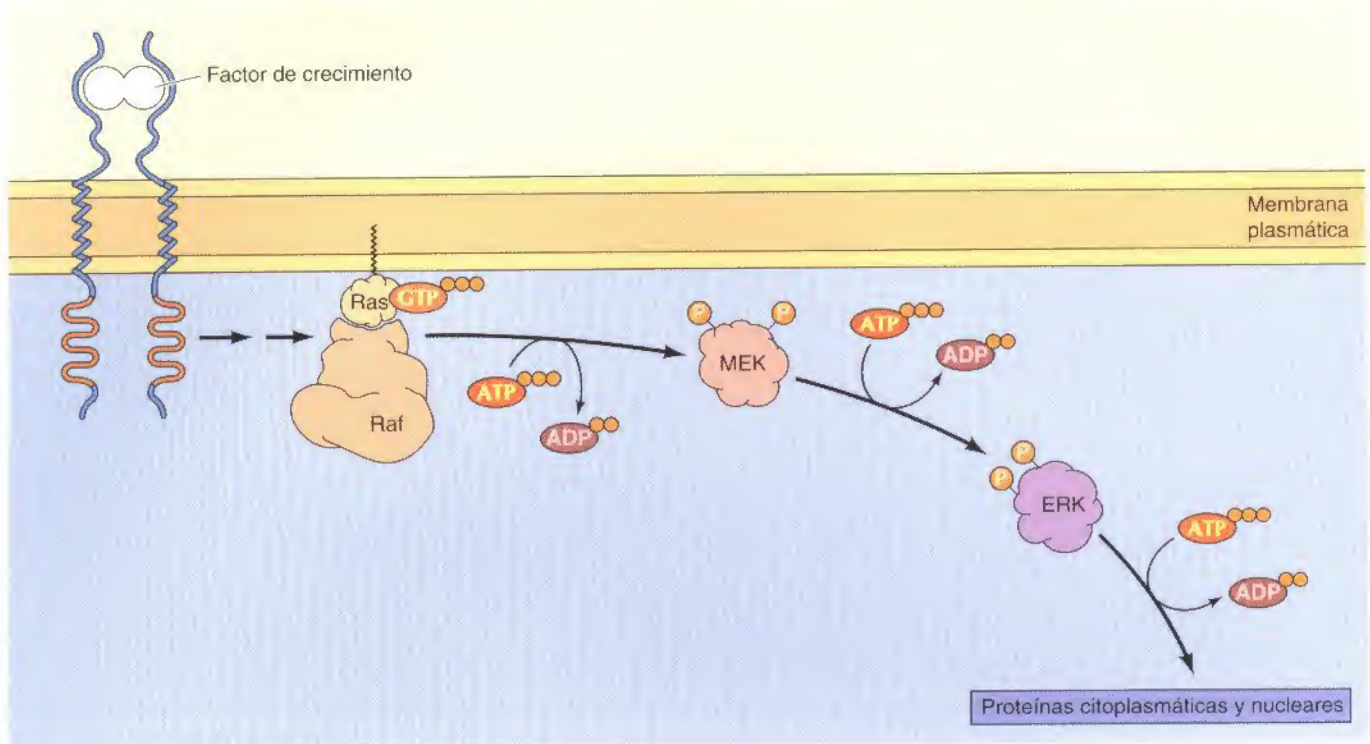



*Figura 13.32*
**Activación de las quinasas MAP ERK.** La estimulación de los receptores de factores de crecimiento activa la pequeña proteína de unión a GTP Ras, que interacciona con la proteína quinasa Raf. Raf fosforila y activa a MEK, una proteína quinasa con doble especificidad, la cual activa a ERK fosforilándola tanto en residuos de treonina como de tirosina (Thr-183 y Tyr-185). Entonces, ERK fosforila a diversidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares.

primera vez como proteínas oncogénicas de virus tumorales que causaban sarcomas en ratas (de ahí el nombre Ras, de virus de *s*arcoma de *ra*tas). El interés acerca de Ras creció considerablemente en 1982, cuando se implicaron por primera vez las mutaciones en el gen *ras* con el desarrollo de cánceres humanos (lo que se tratará en el Cap. 15). La importancia de Ras en la señalización intracelular se puso de manifiesto mediante experimentos en los que se mostraba que la microinyección de la proteína Ras activa inducía la proliferación de las células sanas de mamíferos. Por otro lado, la interferencia con la función de Ras, bien por la microinyección de anticuerpos anti-Ras, o bien por la expresión de un mutante Ras negativo dominante, bloqueaba la proliferación celular inducida por factores de crecimiento. Así, Ras no es solamente capaz de inducir el crecimiento anormal característico de las células cancerosas, sino que parece ser que se requiere en la respuesta de las células normales a la estimulación por los factores de crecimiento.

Las proteínas Ras son proteínas de unión de nucleótidos de guanina que funcionan de manera análoga a las subunidades $\alpha$ de las proteínas G, alternando entre la forma activa unida al GTP y la forma inactiva unida al GDP (Fig. 13.33). Sin embargo, a diferencia de las subunidades $\alpha$ de las proteínas G, Ras actúa como un monómero en vez de unirse a las subunidades $\beta\gamma$. La activación de Ras está mediada por **factores de intercambio de nucleótidos de guanina**, que inducen la liberación del GDP unido y su intercambio por el GTP. El complejo Ras-GTP se inactiva por la hidrólisis del GTP, estimulada por la interacción de Ras-GTP con **proteínas activadoras de la GTPasa**. Es interesante destacar que las mutaciones de los genes *ras* en los cánceres humanos, tienen como efecto la inhibición de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por lo tanto, estas proteínas Ras mutantes permanecen continuamente en la forma activa unida al GTP, dando lugar a la proliferación incontrolada de las células cancerosas aun en ausencia de la estimulación por factores de crecimiento.

Las proteínas Ras son proteínas tipo de una gran familia de, aproximadamente, 50 proteínas relacionadas, denominadas **proteínas pequeñas de unión a GTP**, porque el tamaño de Ras y de las otras proteínas es la mitad que el de la subunidad $\alpha$ de las proteínas G. Mientras que las proteínas Ras regulan

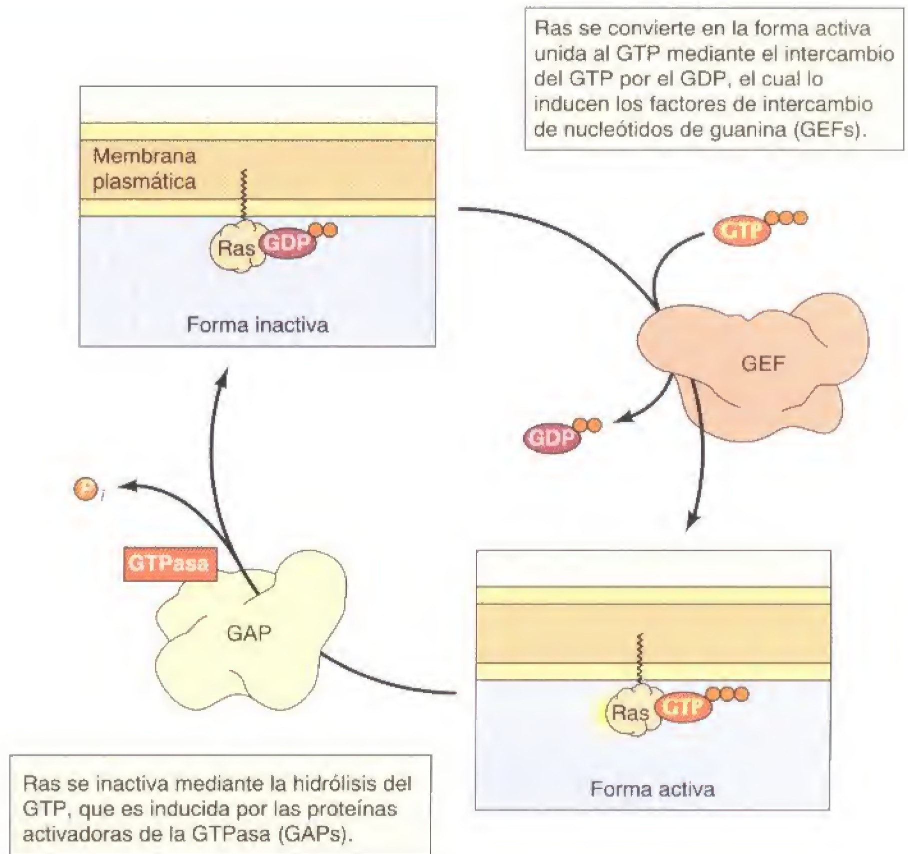



*Figura 13.33*
**Regulación de las proteínas Ras.** Las proteínas Ras alternan entre los estados inactivo, unidas al GDP, y activo, unidas al GTP.

el crecimiento y la diferenciación celular, las otras subfamilias de proteínas pequeñas de unión a GTP controlan otras actividades celulares. Por ejemplo, la mayor subfamilia de proteínas pequeñas de unión a GTP (las proteínas Rab) regulan el tráfico de vesículas, como se vio en el Capítulo 9. Otras proteínas pequeñas de unión a GTP están involucradas en el transporte de proteínas al núcleo (la proteína Ran mencionada en el Cap. 8) y en la organización del citoesqueleto (la subfamilia Rho, como se verá más adelante en este Capítulo).

El mecanismo de activación de Ras mejor comprendido es el mediado por los receptores proteína-tirosina quinasas (Fig. 13.34). La autofosforilación de estos receptores hace que se asocien con factores de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras, a través de proteínas con dominios SH2. Un ejemplo bien caracterizado lo proporciona el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos, que se une a la proteína Grb2 en el citosol de las células no estimuladas, a través del dominio SH2 de esta última. La fosforilación de las tirosinas de los receptores (o de otras proteínas asociadas a los receptores) genera un sitio de unión para los dominios SH2 de las proteínas Grb2. La unión de Grb2 con el receptor activado, coloca a Sos en la membrana plasmática, donde interacciona con las proteínas Ras, que están unidas a la cara interna de la membrana a través de lípidos unidos al C terminal de Ras (véase Fig. 12.10). Sos, entonces, induce el intercambio de nucleótidos de guanina, lo que genera el complejo activo Ras-GTP. En la forma activa unida a GTP, Ras interacciona con varias proteínas efectoras, entre las que se encuentra la proteína-serina/treonina quinasa Raf. Esta interacción con Ras hace que Raf pase de estar situado en el citosol a localizarse en la membrana plasmática, donde es activada mediante la fosforilación por parte de proteína-tirosina y proteína-serina/treonina quinasas.

Como ya se indicó, la activación de Raf inicia una cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de ERK. ERK, entonces, fosforila a diversas proteínas diana incluyendo a otras proteína quinasas. Fundamentalmente, una

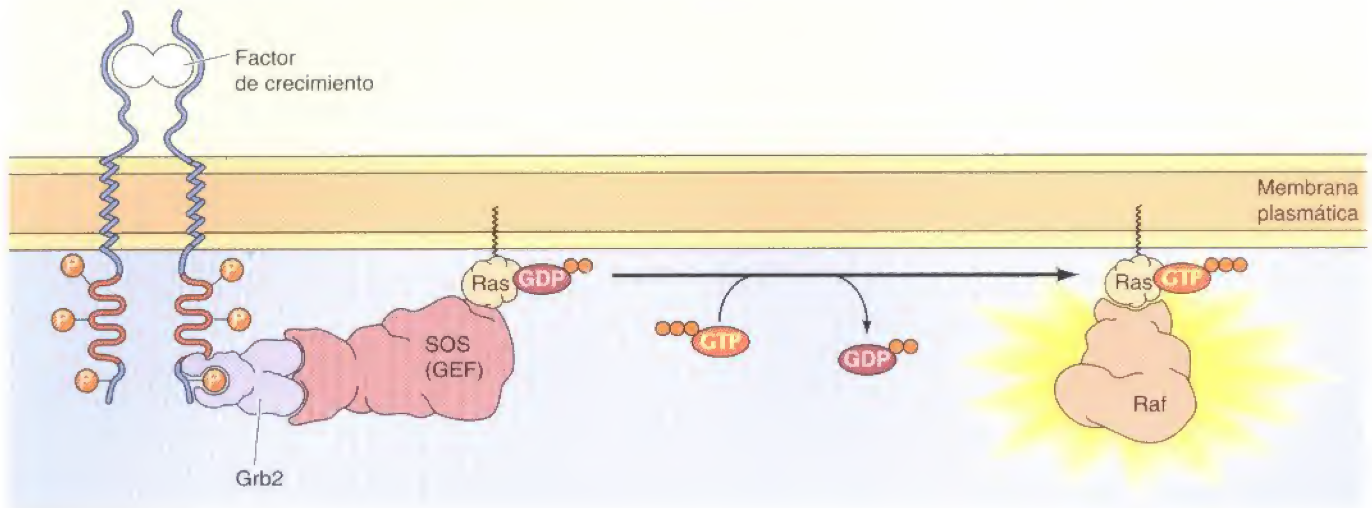



*Figura 13.34*
**Activación de Ras posterior (*downstream*) a los receptores proteína-tirosina quinasas.** El complejo formado por Grb2 y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos, se une a una secuencia de fosfotirosinas en el receptor, a través del dominio SH2 de Grb2. Esta interacción lleva a Sos a la membrana plasmática, donde inducirá el intercambio de GDP/GTP en Ras. Entonces, el complejo Ras-GTP activo se unirá a la proteína quinasa Raf.

fracción de las ERK activadas se transloca al núcleo donde regula a los factores de transcripción mediante fosforilación (Fig. 13.35). En cuanto a esto, es importante señalar que, una primera respuesta a la estimulación por factores de crecimiento es la inducción rápida de la transcripción de una familia de, aproximadamente, 100 genes denominados **genes tempranos inmediatos**. La inducción de determinados genes tempranos inmediatos está mediada por una secuencia reguladora, denominada elemento de **respuesta al suero (SRE)**, que es reconocida por un complejo de factores de transcripción entre los que se incluye el **factor de respuesta al suero (SRF)** y **Elk-1**. ERK fosforila y activa a Elk-1, lo que proporciona un enlace directo entre la familia ERK de quinasas MAP y la inducción de genes tempranos inmediatos. Muchos genes tempranos inmediatos codifican factores de transcripción, por lo que su inducción en respuesta a factores de crecimiento altera la expresión de otra batería de genes posteriores, dando lugar a un nuevo programa de expresión génica.

Tanto las levaduras como las células de mamífero tienen múltiples vías de quinasas MAP que controlan respuestas celulares distintas. Cada cascada está constituida por tres proteína quinasas: una quinasa MAP terminal y dos quinasas anteriores (análogas a Raf y MEK) que regulan su actividad. En la levadura *S. cerevisiae*, son cinco las cascadas diferentes de quinasas MAP que regulan el apareamiento, la esporulación, la generación de filamentos, el remodelado de la pared celular y la respuesta a una elevada osmolaridad. En las células de mamíferos se han identificado al menos cinco quinasas MAP. Además de los miembros de la familia ERK, se diferencian las quinasas MAP JNK y p38 que se activan preferentemente en respuesta a las citoquinas inflamatorias y al estrés celular (p. ej., la radiación ultravioleta) (Fig. 13.36). Mientras que la señalización por ERK conduce principalmente a la supervivencia, diferenciación o proliferación celular, las vías de las quinasas MAP JNK y p38 llevan a la inflamación y a la muerte celular. Al igual que ERK, las MAP quinasas JNK y p38 pueden translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión génica. Por lo tanto, en todos los tipos de células eucariotas actúan múltiples

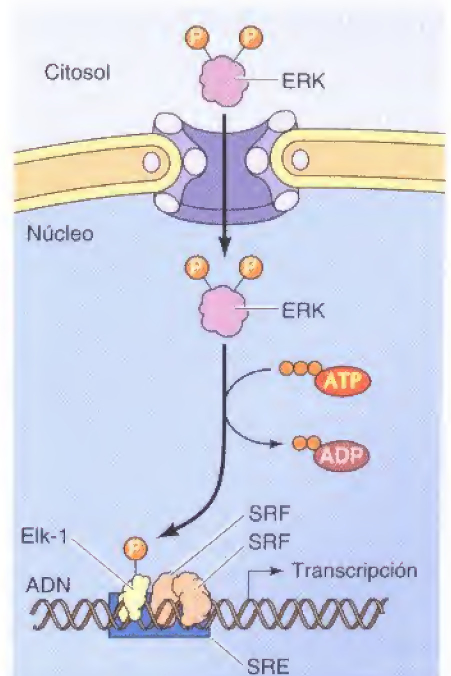



*Figura 13.35*
**Inducción de los genes tempranos inmediatos por ERK.** La ERK activada se transloca al núcleo, donde fosforila al factor de transcripción Elk-1. Elk-1 se une al elemento de respuesta al suero (SRE) formando un complejo con el factor de respuesta al suero (SRF). La fosforilación estimula la actividad de Elk-1 como activador de la transcripción, induciendo a los genes tempranos inmediatos.

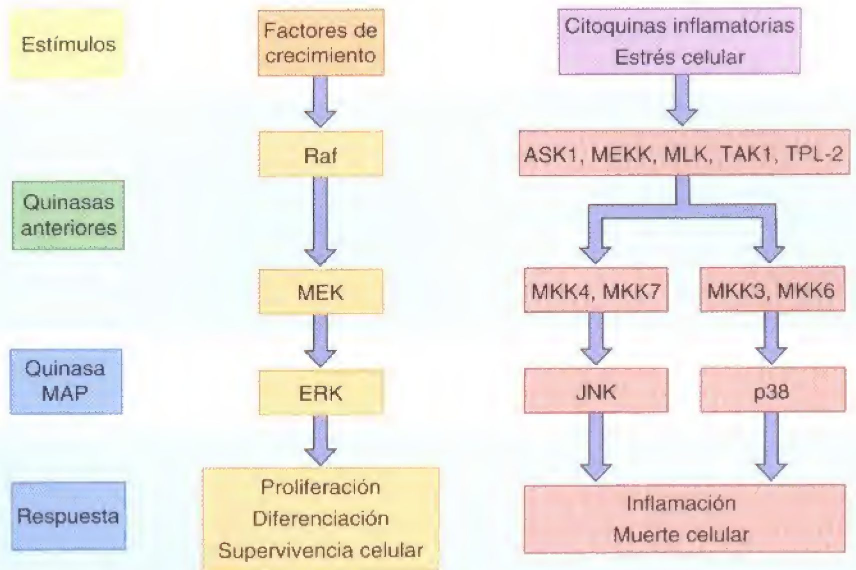



*Figura 13.36*
**Vías de activación de las quinasas MAP en las células de mamíferos.** Además de ERK, las células de mamíferos poseen las quinasas MAP JNK y p38. La activación de JNK y de p38 está mediada por cascadas de proteína quinasas paralelas a las responsables de la activación de ERK. Las cascadas de proteína quinasas que conducen a la activación de JNK y p38 parece que son activadas preferentemente por las citoquinas y el estrés celular, y conducen, en general, a la inflamación o a la muerte celular.

vías de quinasas MAP que controlan las respuestas celulares a las diversas señales ambientales.

La especificidad de la señalización de las MAP quinasas se mantiene, al menos en parte, gracias a la organización de los componentes de cada cascada de MAP quinasas en complejos que están asociados con **proteínas *scaffold*** (andamio, en inglés). Por ejemplo, la proteína scaffold JIP-1 organiza a la MAP quinasa JNK y sus activadores MLK y MKK7 en un complejo de señalización (Fig. 13.37). Como resultado de la asociación específica de estas proteínas quinasa sobre JIP-1, la activación de MLK por un estímulo da lugar a la activación específica y eficaz de MKK7, que a su vez activa a JNK. Diferentes proteínas scaffold están implicadas no sólo en la organización de otros complejos de señalización de MAP quinasas, sino también en la asociación de otras moléculas señalizadoras con sus receptores. La asociación física de los componentes de la vía de señalización, como resultado de la interacción con las proteínas scaffold, se cree que juega un papel importante en la determinación de la especificidad de las vías de señalización en el interior celular.

## *Vía JAK/STAT*

La vía de las quinasas MAP proporciona una conexión indirecta entre la superficie celular y el núcleo, en la que una cascada de proteína quinasas conduce, en último término, a la fosforilación de los factores de transcripción. Una vía alternativa, conocida como la **vía JAK/STAT**, proporciona una conexión más inmediata entre las proteína-tirosina quinasas y los factores de transcripción. En esta vía, la fosforilación de las proteína-tirosinas afecta directamente a la localización y a la función de los factores de transcripción (Fig. 13.38).

Los elementos clave de esta vía son las **proteínas STAT** (*t*ransductores de *s*eñal y *a*ctivadores de *t*ranscripción) que se identificaron originalmente al estudiar la señalización de los receptores de citoquinas. Las proteínas STAT son una familia de factores de transcripción que contienen dominios SH2. Son inactivos en aquellas células que no hayan sido estimuladas, localizándose en el

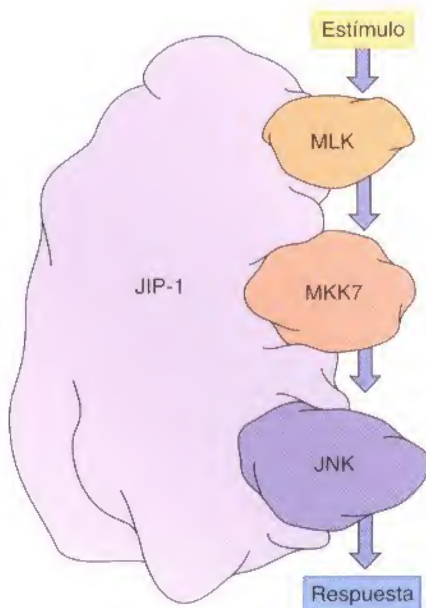



*Figura 13.37*
**Una proteína *scaffold* para la quinasa de la MAP quinasa JNK.** La proteína *scaffold* JIP-1 se une a MLK, MKK7 y JNK, organizando estos componentes de la vía JNK en un complejo.

citoplasma. Al estimularse el receptor de citoquinas, las proteínas STAT se agrupan y se unen, a través de los dominios SH2, al dominio citoplasmático de los polipéptidos receptores, concretamente a las secuencias con fosfotirosinas. Tras su unión a los receptores activados, las proteínas STAT son fosforiladas por miembros de la familia JAK de las proteína-tirosina quinasas no receptoras, que se unen a los receptores de las citoquinas. La fosforilación de las tirosinas induce la dimerización de las proteínas STAT, las cuales se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de sus genes diana.

Estudios posteriores han demostrado que las proteínas STAT también son activadas más allá de los receptores proteína-tirosina quinasas, de tal manera que su fosforilación puede ser catalizada por los mismos receptores o por quinasas asociadas no receptoras. Por lo tanto, los factores de transcripción STAT actúan como un vínculo directo entre las citoquinas y los receptores de los factores de crecimiento en la superficie de la célula por un lado, y la regulación de la expresión génica en el núcleo por el otro.

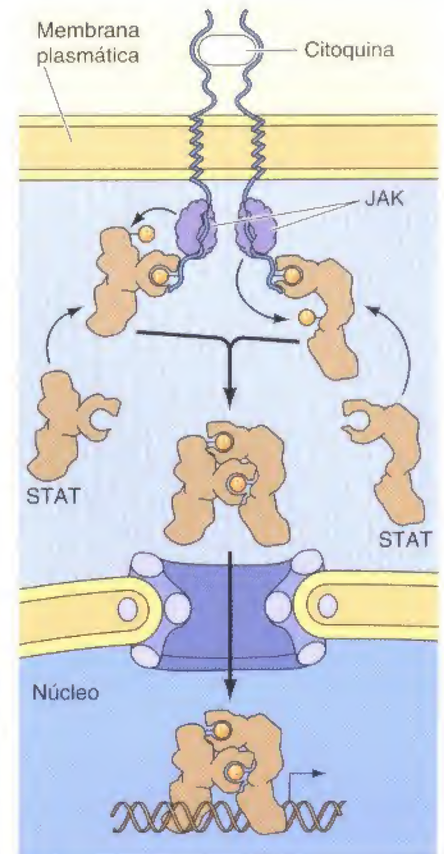



*Figura 13.38*
**Vía JAK/STAT.** Las proteínas STAT son factores de transcripción con dominios SH2, a través de los cuales se unen a aquellas secuencias que contengan fosfotirosina. En las células no estimuladas, las proteínas STAT se encuentran inactivas en el citosol. La estimulación de los receptores de citoquinas provoca que a estos se unan las proteínas STAT, siendo entonces fosforiladas por las proteína-tirosina quinasas JAK, asociadas al receptor. Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo, donde activan la transcripción de los genes diana.

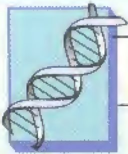
## Transducción de señales y citoesqueleto

Las secciones precedentes se han centrado en las vías de señalización que regulan variaciones en el metabolismo o en la expresión génica, en respuesta a las hormonas y a los factores de crecimiento. Sin embargo, las funciones de la mayoría de las células también están influidas directamente por la adhesión celular y por la organización del citoesqueleto. Así, los receptores responsables de la adhesión celular inician vías de señalización intracelular que regulan otros aspectos del comportamiento celular, incluyendo a la expresión génica. Asimismo, los factores de crecimiento inducen con frecuencia alteraciones en el citoesqueleto, que causan el movimiento de la célula o cambios en su forma. De esta manera, los componentes del citoesqueleto actúan igualmente como receptores y como dianas en las vías de señalización celular, integrando la variación en la forma y el movimiento celular con otras respuestas celulares.

### *Integrinas y transducción de señales*

Como ya se trató en los Capítulos 11 y 12, las integrinas son los principales receptores responsables del anclaje de las células a la matriz extracelular. En dos tipos de uniones célula-matriz (adhesiones focales y hemidesmosomas), las integrinas también interaccionan con componentes del citoesqueleto, promoviendo un vínculo estable entre la matriz extracelular y las células adheridas (véase Fig. 12.62). Además de este papel estructural, las integrinas sirven como receptores que activan vías de señalización intracelular, por lo que controlan la expresión génica y otros aspectos del comportamiento celular en respuesta a la adhesión celular.

Al igual que los miembros de la superfamilia de los receptores de citoquinas, las integrinas tienen segmentos citoplasmáticos cortos que carecen de actividad enzimática alguna. Sin embargo, la fosforilación de las proteína-tirosinas es una respuesta inmediata a la interacción de las integrinas con los componentes de la matriz extracelular, lo que sugiere que las integrinas están asociadas a proteína-tirosina quinasas no receptoras. Una vía de señalización a partir de integrinas implica a la activación de una proteína-tirosina quinasa no receptora denominada **FAK** (*f*ocal *a*dhesion *k*inase) (Fig. 13.39). Tal y como implica su nombre, FAK se localiza en las adhesiones focales y se fosforila rápidamente tras la unión de la integrina a componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina. Al igual que otras proteína-tirosina quinasas, la activación de FAK implica la autofosforilación inducida por la agrupación de integrinas adheridas a la matriz extracelular. La autofosforilación de FAK crea puntos de interacción para otras moléculas señalizadoras que contengan dominios SH2, incluyendo miembros de la familia Src de proteína-tirosina quinasas no receptoras que fosforilan puntos adicionales de FAK. Como se ha visto previamente en el caso de



## Medicina molecular

# *Cáncer, transducción de señales y oncogenes* ras

### La enfermedad

El cáncer acaba con la vida de, aproximadamente, uno de cada cuatro americanos, contabilizándose 550.000 muertes al año en los Estados Unidos. Hay más de cien tipos de cáncer diferentes pero algunos son más comunes que otros. En este país, los cánceres letales más frecuentes son los de pulmón y colon que suman el 40 % de las muertes totales por cáncer. Otros contribuyentes a la mortalidad por cáncer incluyen al cáncer de mama, próstata y páncreas, responsables aproximadamente del 7,2%, 5,2% y el 5,4% respectivamente de las muertes por cáncer en Estados Unidos.

La característica común de todos los cánceres es la proliferación incontrolada de las células cancerosas, que acaban diseminándose por todo el organismo, invadiendo los órganos y tejidos sanos, lo que lleva a la muerte del paciente. La cirugía y la radioterapia son tratamientos eficaces para aquellos cánceres que están localizados, pero no alcanzan a aquellas células cancerosas que se han diseminado a zonas distantes en el organismo. Por lo tanto, el tratamiento de estos cánceres requiere de la quimioterapia. Por desgracia, los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad no actúan específicamente sobre las células cancerosas. La mayoría de ellos dañan el ADN o interfieren con la síntesis del ADN por lo que también acaban con aquellas células sanas que tengan gran capacidad de división, como son las células epiteliales de la superficie del tracto digestivo y las células hematopoyéticas de la médula ósea. La toxicidad de estos medicamentos limita su efectividad, y muchos cánceres no se eliminan mediante aquellas dosis de quimioterapia que el paciente pueda tolerar. Por lo tanto, aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento del cáncer, casi la mitad de los pacientes a los que se diagnostica un cáncer acaban muriendo de dicha enfermedad.

### Bases moleculares y celulares

La identificación de los genes virales que convierten a las células normales en células cancerosas, como el gen *src* del RSV, demostró por primera vez que los cánceres pueden ser causados por la acción de genes específicos (oncogenes). A partir del descubrimiento de que los oncogenes virales están relacionados con genes de las células sanas, se postuló la hipótesis de que los cánceres no inducidos por virus (que incluyen a la mayoría de los cánceres humanos) se deben a mutaciones en los genes de la célula sana, lo que da lugar a oncogenes de origen celular en vez de origen vírico. Estos oncogenes celulares se identificaron en los cánceres humanos en 1981. Seguidamente, se descubrió que los oncogenes humanos del cáncer de vesícula, pulmón y colon, estaban relacionados con los genes *ras*, previamente identificados en los virus causantes de sarcoma en ratas.

Aunque ahora se conocen muchos genes diferentes que desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer, las mutaciones en los genes *ras* siguen siendo una de las alteraciones genéticas más comunes en los tumores humanos. Los oncogenes *ras* mutados se encuentran, aproximadamente, en el 20 % de todos los cánceres humanos, incluyendo el 25 % de cánceres de pulmón, el 50 % de cánceres de colon y más del 90 % de los cánceres de páncreas. Más aún, la acción de los oncogenes *ras* relaciona claramente el desarrollo del cáncer en el hombre con las alteraciones en las vías de señalización que regulan la proliferación celular. Las mutaciones que convierten a los genes *ras* en oncogenes causan la disminución de la hidrólisis del GTP por las proteínas Ras. Por consiguiente, las proteínas oncogénicas Ras mutadas permanecen en su forma activa, unida al GTP, en vez de alternar entre la forma activa e inactiva en respuesta a las señales extracelulares. Por lo tanto, las proteínas oncogénicas Ras están estimulando continuamente la vía de las quinasas MAP, lo que supone una proliferación celular continuada incluso en ausencia de aquellos factores de crecimiento necesarios para activar Ras y las demás señales intracelulares.



Un pólipo de colon humano (un estadio temprano del cáncer de colon). Los oncogenes *ras* contribuyen al desarrollo de aproximadamente la mitad de todos los cánceres de colon. (E. P. Ewing, Jr., Centers for Disease Control.)

los receptores de factores de crecimiento, la fosforilación en tirosinas de FAK crea sitios de unión para dominios SH2 de otras moléculas señalizadoras, incluyendo la fosfolipasa C-$\gamma$, PI 3-quinasa y el complejo Grb2-Sos. El reclutamiento del factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos desencadena la activación de Ras, que a su vez acopla a las integrinas a la activación de la vía ERK. Así, la activación de las proteína-tirosina quinasas FAK y Src por parte de las

## *Cáncer, transducción de señales y oncogenes* ras *(continuación)*

### Prevención y tratamiento

El descubrimiento de oncogenes mutados en los cánceres humanos, lleva consigo la posibilidad de diseñar drogas dirigidas específicamente contra las proteínas oncogénicas. En principio, estas drogas podrían actuar selectivamente contra las células cancerosas, resultando menos tóxicas sobre las células normales que los agentes quimioterapéuticos convencionales. Debido a que *ras* se encuentra mutado con frecuencia en los cánceres humanos, las proteínas Ras han suscitado mucho interés como dianas potenciales de medicamentos. Una característica importante del funcionamiento de las proteínas Ras, es que son destinadas a la membrana celular mediante la adición postraduccional de un lípido (un farnesil isoprenoide) a su extremo C-terminal. Aunque la farnesilación no es exclusiva de Ras, es una modificación de las proteínas celulares relativamente poco frecuente, lo que ha llevado a diversos grupos de investigación a desarrollar inhibidores de la enzima farnesil transferasa como drogas potenciales dirigidas específicamente contra Ras. Se ha hallado que estas drogas no sólo impiden la localización de Ras en la membrana y su función, sino que también actúan frente a las células tumorales humanas. Al menos cuatro inhibidores de la farnesil transferasa se están evaluando actualmente en ensayos clínicos, por lo que muy pronto ya tendremos información disponible acerca del potencial de estas drogas en el tratamiento de los cánceres humanos.

### Referencia

Prendergasrt, G. C. and A. Oliff. 2000. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic properties, mechanisms of action, and clinical prospects. *Semin. Cancer Biol.* 10: 443-452.

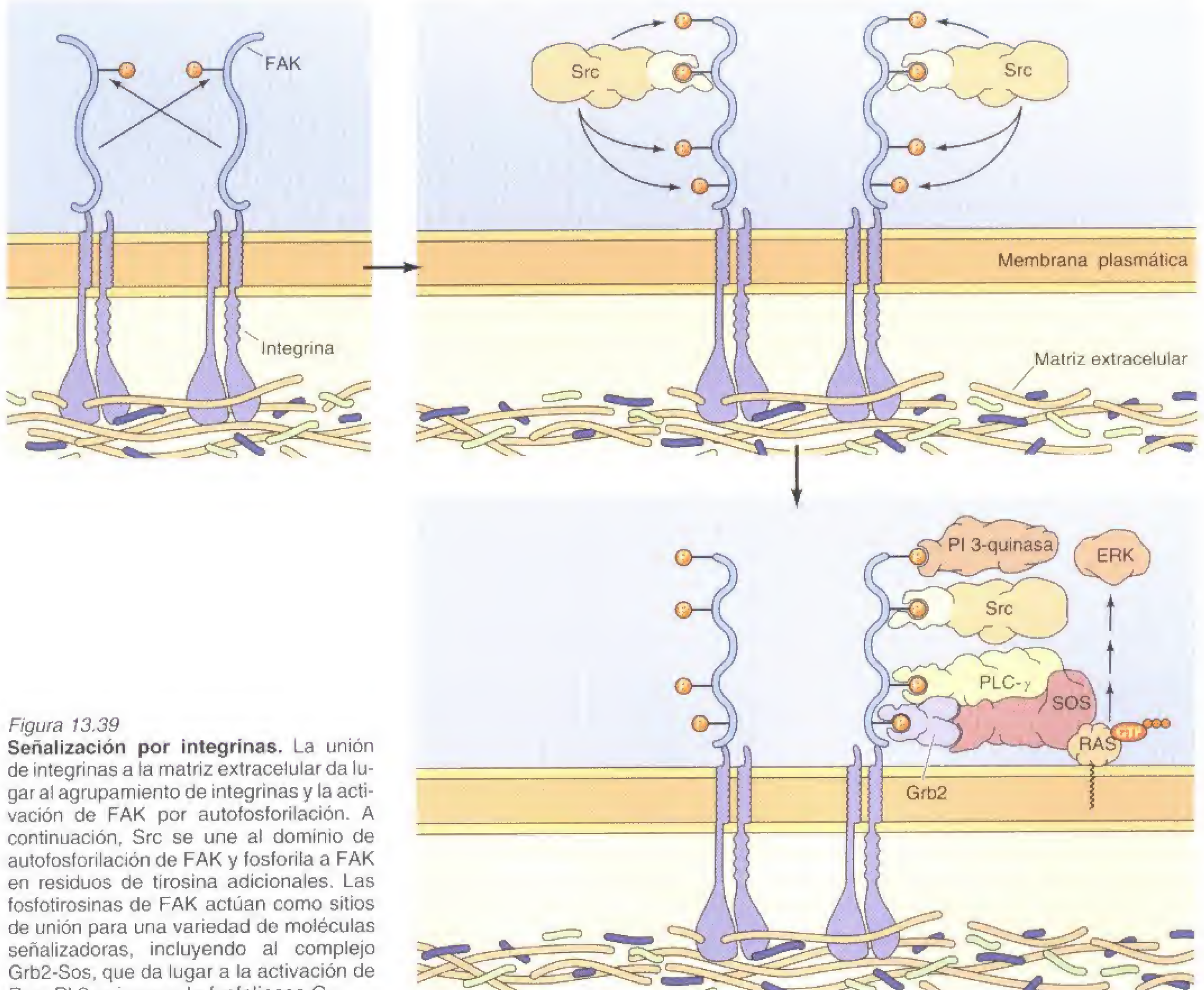



*Figura 13.39*
**Señalización por integrinas.** La unión de integrinas a la matriz extracelular da lugar al agrupamiento de integrinas y la activación de FAK por autofosforilación. A continuación, Src se une al dominio de autofosforilación de FAK y fosforila a FAK en residuos de tirosina adicionales. Las fosfotirosinas de FAK actúan como sitios de unión para una variedad de moléculas señalizadoras, incluyendo al complejo Grb2-Sos, que da lugar a la activación de Ras, PI 3-quinasa y la fosfolipasa C-γ.

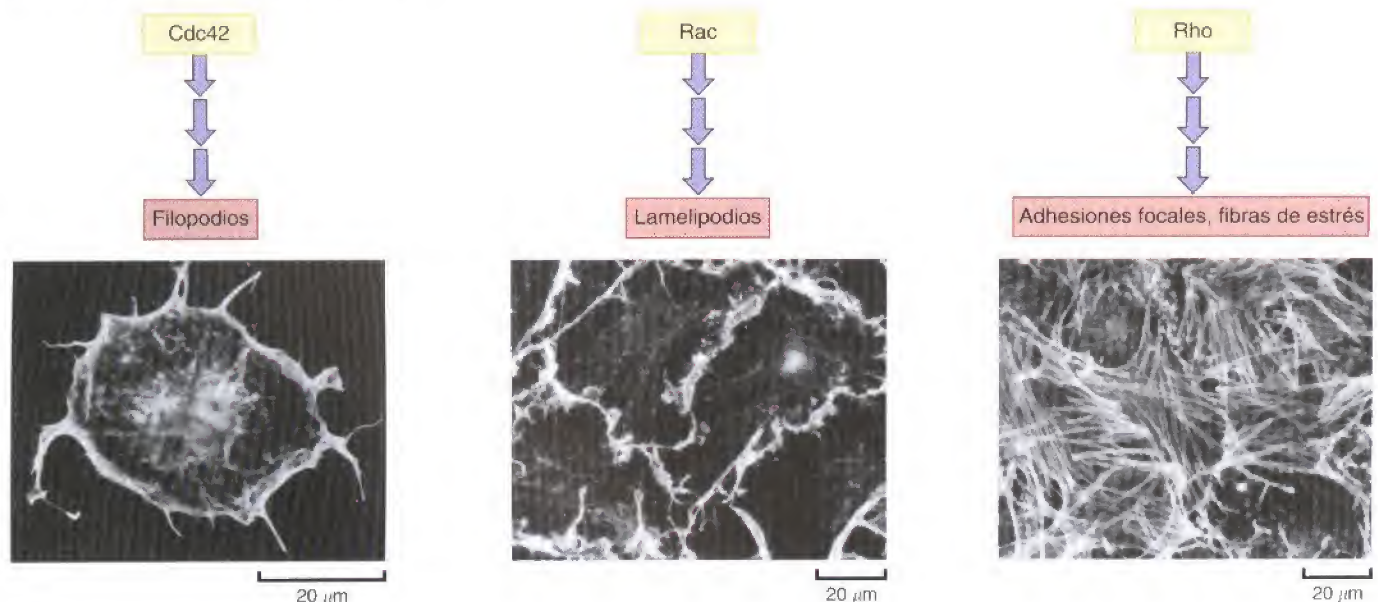
integrinas asocia la adhesión celular a las mismas vías de señalización que regulan la expresión génica, la proliferación celular y la supervivencia de la célula, que se activan en respuesta a los factores de crecimiento. Adicionalmente, las integrinas pueden interaccionar y estimular las actividades de receptores proteína-tirosina quinasa, como el receptor de EGF, dando lugar a la activación paralela de vías de señalización estimuladas por factores de crecimiento y por la adhesión celular.

## *Regulación del citoesqueleto de actina*

Las respuestas de la célula a las señales extracelulares, incluidos los factores de crecimiento, con frecuencia suponen alteraciones en la motilidad y en la forma celular. Por ejemplo, las alteraciones en la motilidad celular (así como en la proliferación celular) inducidas por los factores de crecimiento desempeñan un papel determinante en procesos tales como la cicatrización de heridas o el desarrollo embrionario. Como ya se trató en el Capítulo 11, estos aspectos del comportamiento celular son dirigidos por el citoesqueleto de actina. En concreto, muchos tipos de movimiento celular están basados en el proceso dinámico de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina adyacentes a la membrana plasmática. Por lo tanto, el remodelado del citoesqueleto de actina es un proceso fundamental en la respuesta de muchas células a los factores de crecimiento y a otros estímulos extracelulares.

Los miembros de la subfamilia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP (incluidos **Rho**, **Rac** y **Cdc42**) desempeñan un papel central en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, y por tanto, controlan diversos procesos celulares, incluidos la motilidad celular, la adhesión celular y la citocinesis. El papel de los miembros de la familia Rho como reguladores de diferentes aspectos del remodelado de la actina fue dilucidado, por primera vez, mediante estudios acerca de la respuesta de los fibroblastos a la estimulación por factores de crecimiento (Fig. 13.39). Las alteraciones del citoesqueleto, debidas a la estimulación por los factores de crecimiento, incluían la formación de evaginaciones de la superficie celular (filopodios, lamelipodios y ondulaciones en la membrana) así como la formación de adhesiones focales y fibras de estrés. La microinyección en células, de mutantes específicos de diferentes miembros de la familia Rho, ha demostrado que Cdc42 induce la formación de filopodios, Rac media la formación de lamelipodios y Rho es responsable de la formación de fibras de estrés.

*Figura 13.40*
**Regulación del remodelado de la actina por las proteínas de la familia Rho.** Diferentes miembros de la familia Rho regulan la polimerización de la actina dando lugar a filopodios (Cdc42), lamelipodios (Rac) y adhesiones focales y fibras de estrés (Rho). Las micrografías de fluorescencia muestran la distribución de la actina tras la microinyección en fibroblastos de Cdc42, Rac y Rho. (A partir de C.D. Nobes y A.Hall, 1995. *Cell* 81:53.)



Estudios posteriores han demostrado que la actividad de los miembros de la familia Rho no se restringe a los fibroblastos: desempeñan un papel similar en la regulación del citoesqueleto de actina en todas las células eucariotas. Por ejemplo, Rho se requiere para la citocinesis (la división celular que sigue a la mitosis) que se produce mediante un anillo contráctil de miosina y actina (véase Fig. 11.27). En las neuronas, Rac, Cdc42 y Rho regulan la extensión y la retracción de los axones durante el desarrollo del sistema nervioso. En las células del músculo liso, Rho contribuye a la regulación de la contracción. En las células epiteliales, los miembros de la familia Rho regulan la formación de uniones tipo *adherens*, que suponen la unión de las cadherinas al citoesqueleto de actina (véase Fig. 12.64). Por lo tanto, los miembros de la familia Rho sirven como reguladores universales del citoesqueleto de actina, acoplando las señales extracelulares a las variaciones en el movimiento y en la forma celular. Además, los miembros de la familia Rho pueden activar las vías de señalización de las MAP quinasas, dando lugar a cambios en la expresión génica, además de afectar a otras actividades celulares como el transporte vesicular y la polaridad celular.

Se han identificado un gran número de proteínas como dianas potenciales de Rho, Rac y de Cdc42, y aún ha de establecerse el papel de estos candidatos a proteínas diana. Una de las dianas principales de Rho en la regulación de las alteraciones citoesqueléticas es una proteína-serina/treonina quinasa denominada PKN (Fig. 13.41). La activación de PKN aumenta la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina II por dos mecanismos: PKN no sólo fosforila directamente la cadena ligera de la miosina, sino que también fosforila e inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. El aumento resultante de fosforilación en la cadena ligera de miosina, activa a la miosina y da lugar al ensamblaje de filamentos de actina-miosina, lo que resulta en alteraciones citoesqueléticas como la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales, uniones adherentes y citocinesis. Tanto Rac como Cdc42 dan lugar a la formación de prolongaciones de la superficie celular (filopodios y lamelipodios) estimulando la polimerización de actina. Este proceso parece estar mediado por diversas dianas de Rac y Cdc42 que pueden asociarse con el complejo Arp2/3 (véase Fig. 11.5) para inducir la formación de filamentos de actina, pero los detalles de estas interacciones todavía no se conocen.

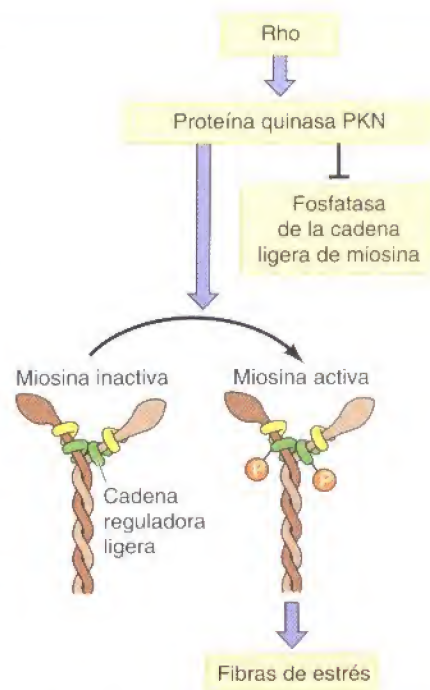



*Figura 13.41*
**Regulación de fosforilación de la cadena ligera de miosina por Rho.** Rho activa la proteína quinasa PKN, que fosforila la cadena reguladora ligera de la miosina II, e inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. El incremento resultante de fosforilación de la cadena ligera, activa a la miosina II, dando lugar al ensamblaje de filamentos de actina-miosina y a la formación de fibras de estrés.

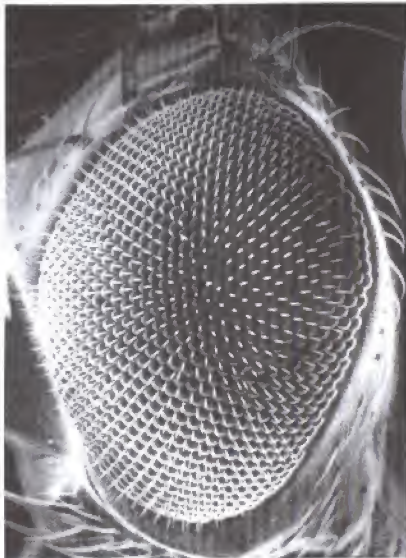
## Señalización en el desarrollo y en la diferenciación

La comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen el desarrollo animal es uno de los principales retos de la biología molecular y celular actual. A partir de una única célula, el huevo fecundado, se generan los distintos tipos celulares que constituyen el organismo, y éstos se organizan en tejidos y órganos. Tanto la diferenciación celular como el desarrollo de las estructuras corporales, han de ser reguladas por complejas vías de señalización intercelular que coordinan la actividad de las células individuales y, en última instancia, dan lugar a organismos tan complejos como el ser humano. Aunque un tratamiento exhaustivo de la biología del desarrollo va más allá del objetivo de este libro, sí es necesario destacar que se han realizado avances significativos en el desciframiento de las vías de señalización responsables de algunos de los procesos de diferenciación y desarrollo. Aquí se tratarán tres ejemplos de estas vías de señalización.

### *Vía del receptor tirosina quinasa/Ras/Raf/ERK en* Drosophila *y en* C. elegans

La señalización a través de receptores tirosina quinasa que activan la vía de la Ras/Raf/ERK regula la diferenciación y el desarrollo de muchos tipos celulares. Un ejemplo bien estudiado en los vertebrados lo proporciona la diferenciación de las neuronas, que está mediada por la activación del receptor del factor de crecimiento nervioso (un receptor tirosina quinasa), y la consiguiente estimula-

(A)



(B)

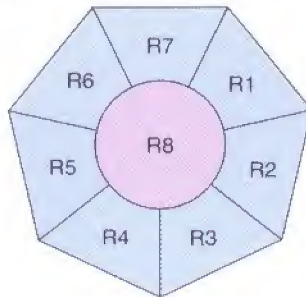



*Figura 13.42*
**Ojo compuesto de *Drosophila*.** (A) Micrografía al microscopio electrónico de barrido que muestra el ojo compuesto, constituido por unas 800 unidades individuales. (B) Cada unidad está constituida por ocho neuronas fotorreceptoras (designadas R1 a R8) que se desarrollan en un orden y según un patrón fijo. (A, cortesía de T. Venkatesh, City College of New York.)

ción de la vía Ras/Raf/ERK. Sin embargo, el papel clave de esta vía en el desarrollo se ha demostrado de una manera más clara en los organismos modelo *Drosophila* y *C. elegans*.

La señalización a través de la vía Ras/Raf/ERK desempeña un papel fundamental en el desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*, lo que también ilustra el papel de la señalización directa célula-célula en la diferenciación. El ojo compuesto de *Drosophila* está constituido por 800 unidades individuales, cada una de las cuales tiene ocho neuronas fotorreceptoras (R1 a R8) y 12 células con función de lente o cristalino (Fig. 13.42). Las neuronas fotorreceptoras se desarrollan según una secuencia predeterminada, comenzando con la diferenciación de R8. R8 induce la diferenciación de dos células vecinas para dar lugar a los fotorreceptores R2 y R5. A continuación, R2 induce la diferenciación de las células vecinas dando lugar a R1 y R3, y R5 induce a las células vecinas a diferenciarse en R4 y R6. Por último, la diferenciación de R7 está inducida mediante la interacción con R8. Las células del cristalino se desarrollan a partir de aquéllas que no se han diferenciado en fotorreceptores.

La vía de señalización que conduce al desarrollo de la célula R7 se ha caracterizado en detalle, a partir del aislamiento de moscas mutantes en las que no se produce el desarrollo de R7 (Fig. 13.43). Uno de estos mutantes (*sevenless*) se debe a la alteración en un gen que codifica un receptor proteína-tirosina quinasa, que se expresa en precursores de células R7. Otro mutante denominado *boss* (del acrónimo de *bride-of-sevenless*) es debido a alteraciones en un gen que codifica una proteína de superficie celular expresada por las células R8. Boss es el ligando de Sevenless, por lo que la interacción directa célula-célula entre R8 y la célula precursora, activa a la proteína-tirosina quinasa Sevenless. Otros estudios muestran que la diferenciación celular inducida por Sevenless también requiere de Raf y Ras, lo que significa que se activará la vía de la MAP quinasa ERK y la fosforilación de los factores de transcripción responsables de la diferenciación de R7.

El desarrollo de la vulva en el nemátodo *C. elegans* es otro ejemplo en el que el papel de la vía Ras/Raf/ERK se ha dilucidado a partir del análisis genético. En este sistema, en primer lugar, se diferencia una única célula convirtiéndose en una célula de anclaje gonadal que asocia la vulva al útero. Entonces, la célula de anclaje induce la diferenciación de tres células precursoras, que proliferan hasta formar las 22 células de la vulva.

El aislamiento de mutantes en los que no se desarrolla la vulva ha permitido la caracterización de varios genes necesarios para la inducción de la vulva, mostrando la vía mediante la que la célula de anclaje señaliza la diferenciación

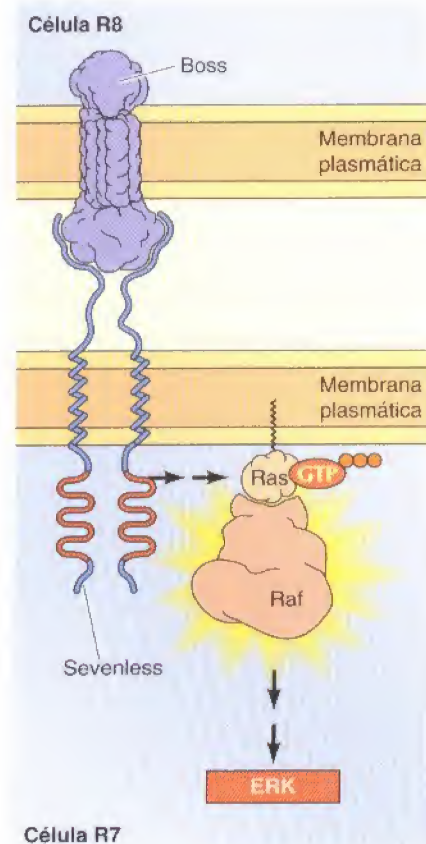



*Figura 13.43*
**Inducción de la diferenciación de R7.** La diferenciación de la neurona fotorreceptora R7 se induce mediante el contacto de la célula precursora con R8. La proteína Boss, en la superficie de la célula R8, es el ligando del receptor proteína-tirosina quinasa Sevenless, que se expresa en las células precursoras de R7. La estimulación de Sevenless activa la vía Ras/Raf/quinasa MAP ERK.

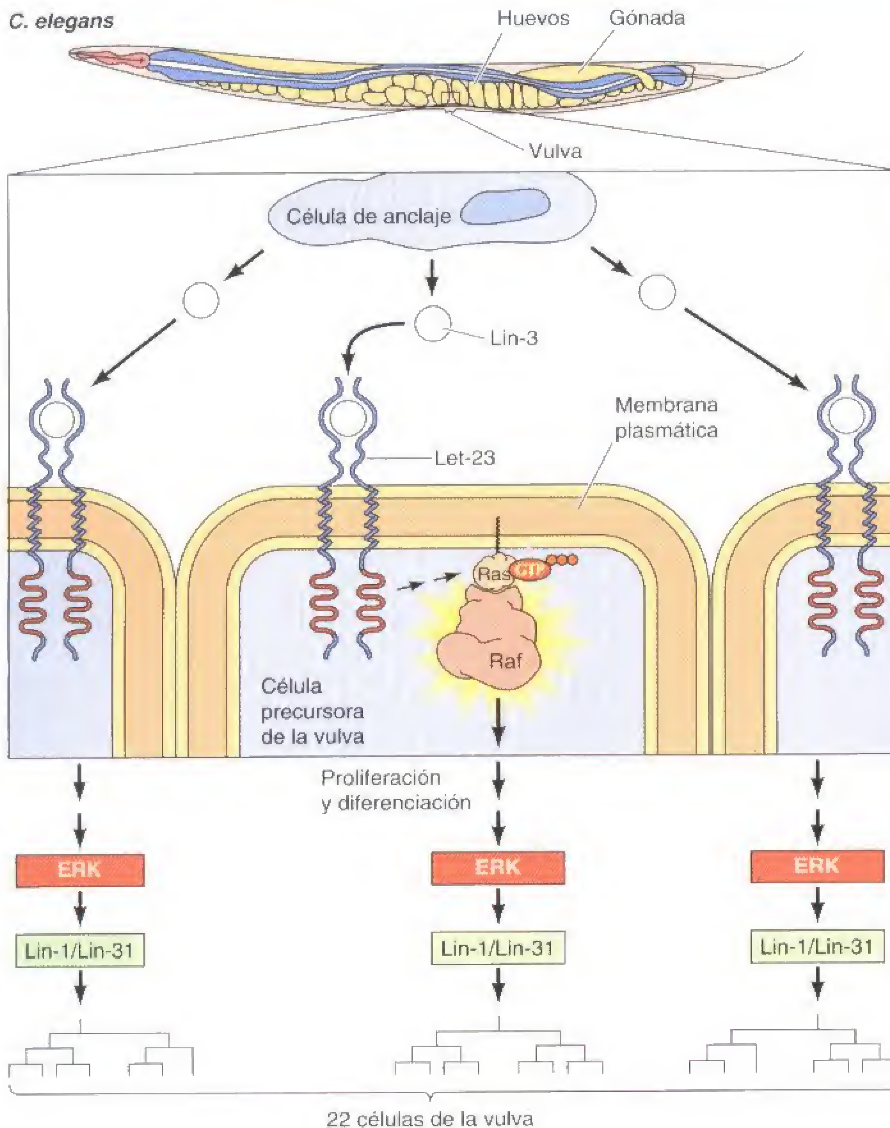



*Figura 13.44*
**Inducción de la vulva en *C. elegans*.** La célula de anclaje gonadal secreta Lin-3, que está relacionada con el EGF. Lin-3 estimula a Lin-23, un receptor proteína-tirosina quinasa expresado por las células precursoras de la vulva. Lin-23 activado estimula la vía Ras/Raf/ERK. ERK fosforila a dos factores de transcripción (Lin-1 y Lin-31), que inducen a tres células precursoras de la vulva a proliferar y a diferenciarse, dando lugar a las 22 células de la vulva.

de las células precursoras (Fig. 13.44). Uno de estos genes, *lin-3*, codifica para una proteína relacionada con el factor de crecimiento de mamíferos EGF. La proteína Lin-3 es secretada por las células de anclaje y se une a un receptor (Let-23) que se expresa en la superficie de las células precursoras de la vulva. Let-23 es un receptor proteína-tirosina quinasa relacionado con el receptor del EGF de los mamíferos. Otros genes necesarios para la inducción de la vulva incluyen a *let-60* y a *lin-45*, que codifican respectivamente a las proteínas Ras y Raf de *C. elegans*. Por lo tanto, el desarrollo de la vulva en *C.elegans* supone que un receptor proteína-tirosina quinasa se active por un factor de crecimiento, y la consiguiente activación de la vía de señalización Ras/Raf. Esto conduce a que se active la quinasa MAP ERK, que fosforila a dos factores de transcripción (Lin-1 y Lin-31) responsables de la inducción de la vulva.

## *Hedgehog y Wnt*

Las vías de **Hedgehog** y de **Wnt** son sistemas de señalización que están íntimamente relacionados y desempeñan un papel fundamental en la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario. Tanto la vía de Hedgehog como la de Wnt se describieron por primera vez en *Drosophila*, pero se han encontrado miembros de la familia Hedgehog y Wnt que controlan un gran

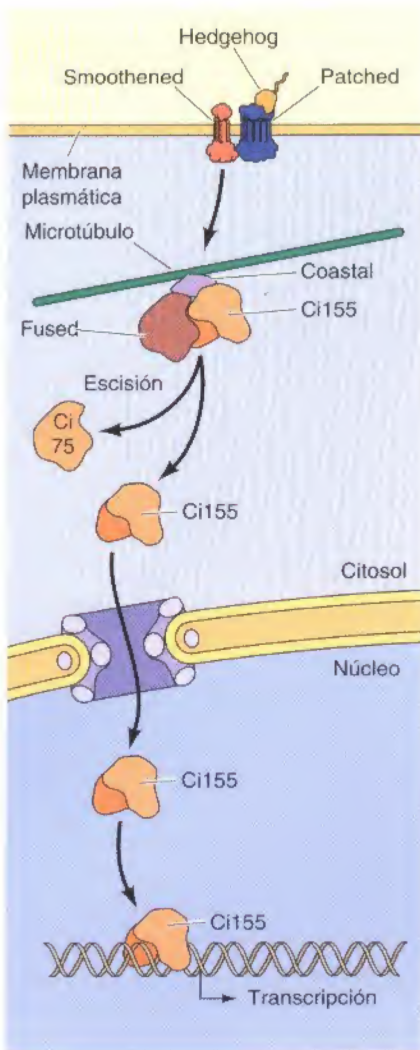



*Figura 13.45*
**Señalización por Hedgehog.** El polipéptido Hedgehog, modificado por la adición de colesterol, se une a Patched en la superficie de la célula diana. Esto anula la inhibición de Smoothened por Patched, lo que permite a Smoothened propagar una señal intracelular. La señal desde Smoothened desensambla un complejo en el que el factor de transcripción Cubitus Interruptus (Ci) se encuentra unido a los microtúbulos a través de la proteína Coastal, junto con la proteína quinasa Fused. Dentro de este complejo, Ci se escince para formar un repesor transcripcional (Ci75). La separación del complejo permite que la Ci155 se transloque al núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana.

número de procesos responsables de la generación del patrón celular durante el desarrollo embrionario, tanto en vertebrados como en invertebrados. Ejemplos de los procesos regulados por estas vías de señalización son la determinación de los tipos celulares y la construcción del patrón celular durante el desarrollo de las extremidades, del sistema nervioso, del esqueleto, pulmones, pelo, dientes y gónadas.

Los genes *hedgehog* (uno en *Drosophila* y al menos tres en vertebrados) codifican proteínas secretadas que son modificadas por la adición de colesterol. Parece ser que esta modificación permite el anclaje de los polipéptidos a la superficie celular, lo que limita el campo de acción de esta vía. El receptor funcional para Hedgehog está constituido por dos proteínas transmembrana, Patched y Smoothened (Fig. 13.44). Hedgehog se une a Patched, que actúa como un regulador negativo de Smoothened. La unión de Hedgehog a Patched permite a Smoothened propagar una señal intracelular. Smoothened tiene siete hélices $\alpha$ transmembrana, y por lo tanto, su estructura es similar a la de los receptores acoplados a proteínas G (véase Fig. 13.10). Sin embargo, Smoothened no está acoplado a una proteína G y el mecanismo de señalización desde Smoothened todavía no se ha descifrado. En *Drosophila* (Gli en mamíferos), la diana de la señalización por Smoothened es un factor de transcripción denominado Cubitus Interruptus (Ci), que se encuentra formando un complejo con la proteína quinasa denominada Fused y con la proteína denominada Coastal, que a su vez está relacionada con la quinesina. En ausencia de la señalización por Smoothened, este complejo se encuentra asociado con los microtúbulos, presumiblemente mediante la interacción de Coastal con la tubulina, y Ci se escinde para generar un represor transcripcional (Ci75). La activación de Smoothened provoca la disociación del complejo de los microtúbulos y la translocación de Ci de secuencia completa (Ci155) al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes diana. Hay que destacar que entre las dianas de Ci se incluyen genes que codifican para miembros de la familia Wnt, lo que proporciona un vínculo directo entre las vías de señalización de Hedgehog y Wnt.

Las proteínas Wnt son una familia de factores de crecimiento secretados que se unen a receptores de la familia Frizzled (Fig. 13.45). Los receptores Frizzled están relacionados con Smoothened e igualmente tienen siete hélices $\alpha$ transmembrana y no están acoplados a proteínas G. La señalización desde Frizzled provoca la fosforilación de una proteína citoplasmática denominada Dishevelled y la inhibición de la proteína quinasa glucógeno sintetasa quinasa-3 (GSK-3). La GSK-3 fosforila y estimula la degradación de la $\beta$-catenina, que se vio en el Capítulo 11 como una proteína transmembrana que conecta a las cadherinas con la actina en las uniones adherentes (ver Fig. 11.15). Resulta interesante el hecho de que conectar las cadherinas a la actina es sólo uno de los papeles de la $\beta$-catenina. En la señalización mediada por Wnt, la $\beta$-catenina actúa como un regulador directo de la expresión génica, formando un complejo con miembros de la familia Tcf/LEF de factores de transcripción. La asociación de la $\beta$-catenina convierte a los miembros de la familia Tcf/LEF de represores a activadores de la transcripción, desencadenando la expresión de genes diana que codifican otras moléculas señalizadoras y una variedad de factores de transcripción que controlan el destino celular.

## *Señalización por Notch*

La vía de **Notch** es otra vía de señalización altamente conservada que controla el destino celular durante el desarrollo animal. Al igual que la vía de señalización que conducía a la diferenciación de la neurona fotorreceptora R7 en *Drosophila*, la señalización por Notch es un ejemplo de interacción directa célula-célula durante el desarrollo. Funciona en todos los estadios del desarrollo para regular la proliferación, supervivencia y diferenciación celular en organismos que van desde *Drosophila* y *C. elegans* hasta el ser humano.

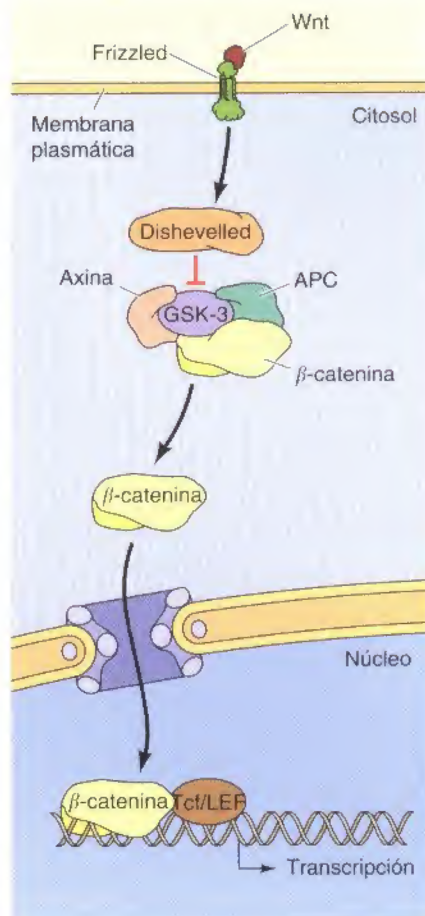



*Figura 13.46*
**Vía de Wnt.** Los polipéptidos Wingless (Wnt) se unen a los receptores de la superficie celular de la familia Frizzled. La señalización desde Frizzled conduce a la inhibición de la proteína quinasa GSK-3, dando lugar a la estabilización de la β-catenina, que forma un complejo con los factores de transcripción Tcf/LEF. Esto transforma a los miembros de la familia Tcf/LEF de represores a activadores, estimulando la expresión de genes diana.

Notch es una proteína grande, con un único dominio transmembrana, que actúa como receptor de proteínas transmembrana (p. ej., Delta) de la superficie de células adyacentes (Fig. 13.47). La estimulación de Notch inicia una vía de activación de la transcripción nueva y directa. En concreto, la unión del ligando provoca la ruptura proteolítica de Notch y, entonces, el dominio intracelular de Notch se transloca al núcleo. El dominio intracelular de Notch interacciona con otro factor de transcripción (denominado Su(H) en *Drosophila* o CBF-1 en mamíferos) e induce la expresión de sus genes diana. Al igual que en la vía de señalización de Wnt, entre los genes diana de Notch se encuentran genes que codifican para otras proteínas reguladoras de la transcripción, cuya función es determinar el destino celular.

## Regulación de la muerte celular programada

La **muerte celular programada** es un mecanismo fisiológico normal de muerte celular, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los tejidos adultos y en el desarrollo embrionario. En el adulto, la muerte celular programada es la responsable de que se mantenga el equilibrio con la proliferación celular, y de mantener constante el número de células en aquellos tejidos sometidos a un continuo recambio celular. Por ejemplo, en los humanos, diariamente se eliminan unas $5 \times 10^{11}$ células sanguíneas mediante la muerte celular programada, equilibrando así su producción constante por la médula ósea. Además, la muerte celular programada constituye un mecanismo de defensa mediante el que las células alteradas, potencialmente peligrosas, son eliminadas por el bien del organismo. Las células infectadas por virus con frecuencia sufren la muerte celular programada, lo que evita que se generen nuevas partículas víricas y que se propague el virus por el organismo hospedador. Otro tipo de alteraciones, como las lesiones en el ADN, también inducen la muerte celular programada. En este caso, se eliminan las células portadoras de mutaciones potencialmente dañinas, incluyendo aquellas células con mutaciones que pudieran desembocar en el desarrollo de un cáncer.

Durante el desarrollo, la muerte celular programada desempeña un papel clave eliminando aquellas células innecesarias en diversidad de tejidos. Por ejemplo, es la responsable de eliminar los tejidos larvarios durante la metamorfosis de los insectos y anfibios, así como de eliminar el tejido interdigital durante la formación de los dedos de los pies y de las manos. Otro caso bien caracterizado de muerte celular programada lo proporciona el desarrollo del sistema nervioso de los mamíferos. Durante aquel, se produce un número excesivo de neuronas y se eliminan por muerte celular programada hasta el 50 % de las neuronas en desarrollo. Aquéllas que sobreviven se seleccionan por haber realizado correctamente la conexión con sus células diana, las cuales secretan factores de crecimiento que permiten la supervivencia celular mediante el bloqueo del programa

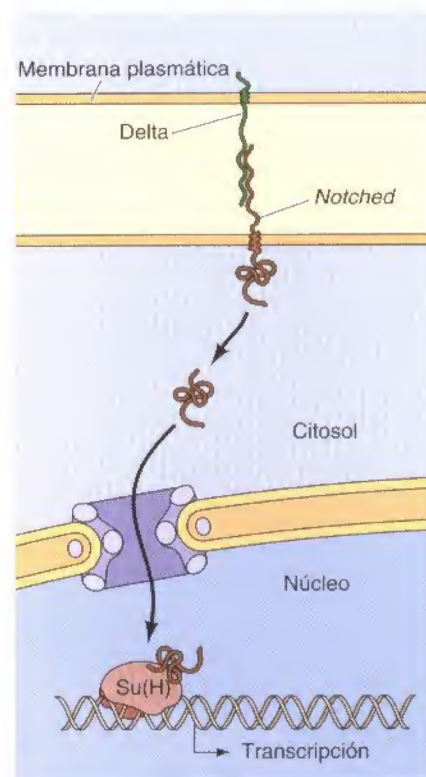



*Figura 13.47*
**Señalización por Notch.** Notch actúa como un receptor de proteínas transmembrana (p. ej., Delta) de las células adyacentes, en la señalización directa célula-célula. La unión de Delta provoca la rotura proteolítica de Notch, liberándose el dominio intracelular de Notch, que se transloca al núcleo e interacciona con un factor de transcripción [Su(H) o CBF-1] y se induce la expresión génica.

de muerte celular neuronal. La supervivencia de muchos otros tipos celulares en animales depende, de igual manera, de factores de crecimiento o del contacto con las células adyacentes o con la matriz extracelular, por lo que se considera que la muerte celular programada desempeña un papel importante en la regulación de la asociación celular en los tejidos. La muerte celular programada se regula a través de la actividad conjunta de diversas vías de señalización, algunas induciendo la muerte celular y otras promoviendo la supervivencia de la célula.

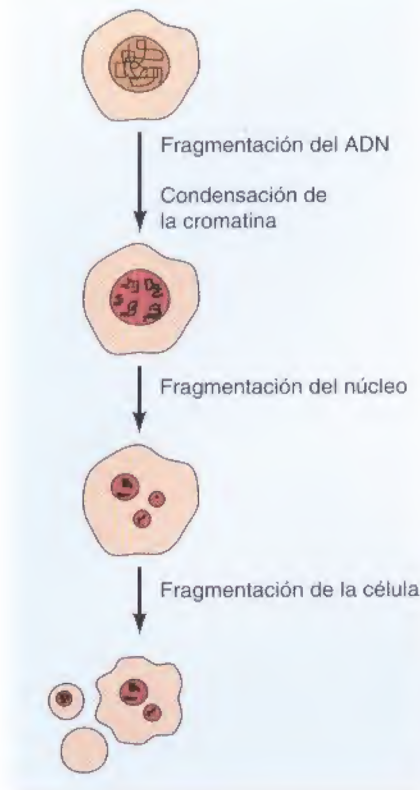
## *Caspasas y apoptosis*

Frente a la muerte accidental de las células debida a una lesión aguda, la muerte celular programada es un proceso activo que se caracteriza por una variación morfológica denominada **apoptosis** (Fig. 13.48). Durante la apoptosis, el ADN cromosómico se fragmenta como resultado de la rotura entre los nucleosomas. La cromatina se condensa y, entonces, el núcleo se rompe en pequeños trozos. Por último, la célula se encoge y se rompe en fragmentos rodeados por membrana denominados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas y estos fragmentos celulares son reconocidos y fagocitados por macrófagos o células adyacentes, por lo que las células que mueren por apoptosis son retiradas de los tejidos de manera eficaz. Por el contrario, las células que mueren debido a una lesión, se hinchan y se lisan liberando su contenido al espacio extracelular causando la inflamación.

A partir del estudio de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C.elegans*, se han identificado tres genes que desempeñan un papel clave en la regulación y la ejecución de la apoptosis. Durante el desarrollo normal del nemátodo, se eliminan por muerte celular programada 131 células somáticas de un total de 1090. Se requieren dos genes, *ced-3* y *ced-4*, para que tenga lugar la apoptosis; si alguno de estos dos genes está inactivado, no se produce la muerte celular programada normal. Un tercer gen, *ced-9*, funciona como un regulador negativo de la apoptosis. Si *ced-9* está inactivado por mutación, las células que normalmente sobrevivirían son incapaces de hacerlo, entrando en apoptosis, lo que conduce a la muerte del animal en desarrollo. Por el contrario, si *ced-9* se expresa a niveles anormalmente altos, no se produce la muerte celular programada normal.

En mamíferos se han identificado genes relacionados con *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*, y se ha encontrado que codifican proteínas, conservadas en la evolución, que son reguladores y efectores de apoptosis inducida por diversos estímulos. Ced-3 es el prototipo de una familia de más de doce proteasas, denominadas **caspasas** porque tienen residuos de cisteína (C) en su sitio activo e hidrolizan a partir de residuos de ácido aspártico (Asp) en la proteína sustrato. Las caspasas son los efectores últimos de la muerte celular programada, produciendo la apoptosis mediante la rotura de más de 100 proteínas celulares distintas. Entre las dianas de las caspasas se incluye un inhibidor de la ADNasa que, cuando se activa, es el responsable de la fragmentación del ADN nuclear. Además, las caspasas rompen las láminas nucleares, lo que lleva a la fragmentación del núcleo y de las proteínas del citoesqueleto, lo que provoca la desorganización del citoesqueleto, la deformación de la membrana y la fragmentación de la célula.

Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten a la forma activa por rotura proteolítica, catalizada por otras caspasas. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de las otras caspasas y a la muerte de la célula. Por lo tanto, la regulación de la activación de las caspasas es fundamental para determinar la supervi-



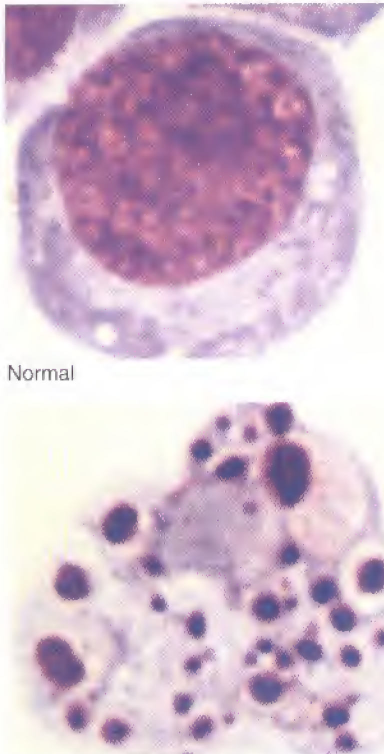




*Figura 13.48*
**Apoptosis.** (A) Representación esquemática de los sucesos que ocurren durante la apoptosis. (B) Micrografías al microscopio óptico de células de leucemia humanas normales y apoptóticas, mostrando la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear durante la apoptosis. (B, cortesía de D. R. Green/La Jolla Institute for Allergy and Immunology.)

vencia celular. Ced-4 y su homólogo en mamíferos (Apaf-1) se unen a caspasas e inducen su activación formando un complejo en el que dos caspasas se rompen y se activan la una a la otra. Por el contrario, Ced-9 inhibe la activación de las caspasas. Los mamíferos codifican una familia entera de proteínas (denominada la familia **Bcl-2**) que están relacionadas con Ced-9. Algunos miembros de la familia Bcl-2, incluyendo a la propia Bcl-2, funcionan de manera análoga a Ced-9 como inhibidores de la activación de las caspasas y de la muerte celular programada. Sin embargo, otros miembros de la familia Bcl-2 promueven la muerte celular. Las caspasas también están reguladas por una familia de proteínas denominas **IAPs**, de *p*roteínas *i*nhibidoras de la *a*poptosis, que inhiben la apoptosis mediante la inhibición directa de la actividad caspasa.

En las células de mamífero, los miembros de la familia Bcl-2 actúan en las mitocondrias, que juegan un papel central en el control de la muerte celular programada (Fig. 13.49). Una de las caspasas iniciadoras clave en las células de mamifero (caspasa 9) se activa, como Ced-3 en *C. elegans*, mediante la formación de un complejo con el homólogo de Ced-4, Apaf-1. En mamíferos, la formación de este complejo también requiere el citocromo c, que es liberado de las mitocondrias por estímulos que inician la apoptosis. Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo c se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (ver Fig. 10.8), mientras que Apaf-1 y la caspasa-9 se encuentran en el citosol, de modo que la caspasa-9 permanece inactiva. Sin embargo, muchos estímulos que inician la muerte celular, incluido el daño del ADN y la falta de factores de crecimiento, dan lugar a daños en las mitocondrias que liberan el citocromo c al citosol. En el citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 y desencadena la formación de un complejo multisubunidad Apaf-1/caspasa-9 denominado **apoptosoma**, en el que se activa la caspasa-9. A continuación, la caspasa-9 escinde y activa a otras caspasas efectoras, como la caspasa-3, dando lugar, finalmente, a la muerte celular. Miembros de la familia Bcl-2 actúan en la membrana mitocondrial regulando la integridad mitocondrial y la liberación

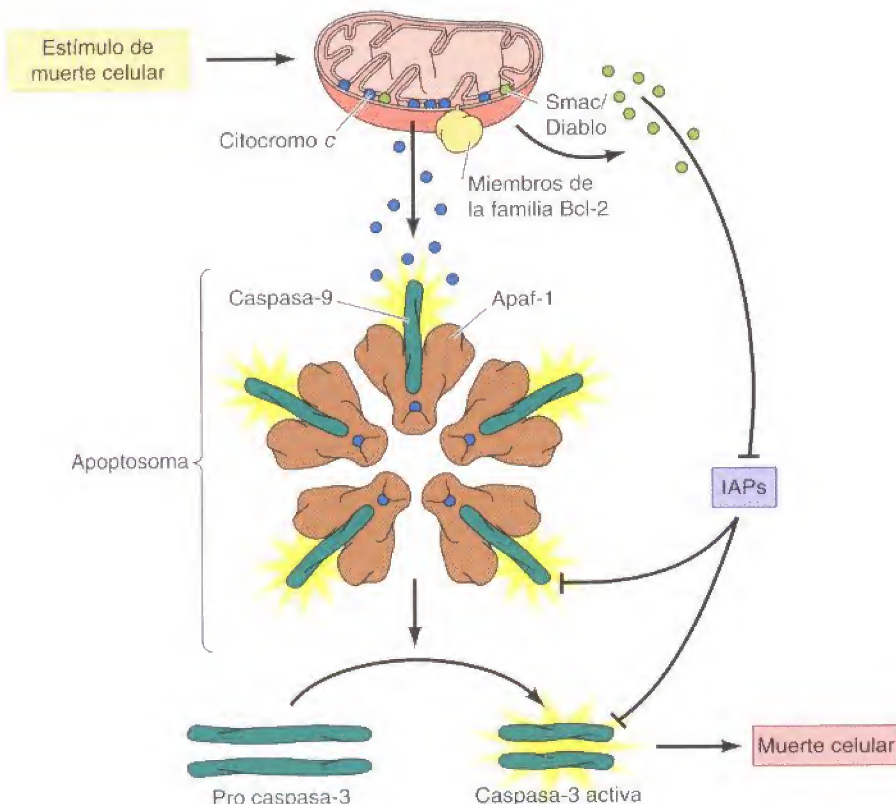



*Figura 13.49*
**Reguladores y efectores de la apoptosis.** En las células de mamífero, muchas señales de muerte celular inducen apoptosis como resultado de daños de las mitocondrias, resultando en la liberación de citocromo c y otras moléculas proapoptóticas como Smac/Diablo, del espacio intermembrana. Los miembros de la familia Bcl-2 actúan en la membrana mitocondrial externa, regulando la integridad de la mitocondria. La liberación del citocromo c de la mitocondria desencadena la formación de complejos (apoptosomas) que contienen Apaf-1 y caspasa-9, en los que se activa la caspasa-9. A continuación, la caspasa-9 activa a otras caspasas, como la caspasa-3, mediante escisión proteolítica. Las moléculas Smac/Diablo estimulan la muerte celular interfiriendo en la acción de los IAPs, que son inhibidores de las caspasas.

del citocromo c. Los miembros de la familia Bcl-2 que inhiben la apoptosis (como la propia Bcl-2) previenen la liberación del citocromo c, mientras que los miembros de la familia Bcl-2 que estimulan la muerte celular actúan induciendo el daño mitocondrial, la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas. Hay que destacar que el daño mitocondrial resulta no sólo en la liberación del citocromo c, sino también de otras moléculas que estimulan la apoptosis. Estas incluyen a una proteína (denominada Smac/Diablo) que estimula la actividad caspasa interfiriendo con la acción de los IAPs. Como se estudia más adelante, las caspasas, los miembros de la familia Bcl-2 y los IAPs son dianas críticas de las vías de señalización que controlan la supervivencia de las células de mamífero.

## *Receptores implicados en la muerte celular y la activación de las caspasas*

Algunos polipéptidos secretados señalizan la muerte celular programada a través de la activación de receptores que inducen directamente la apoptosis de la célula diana. Estas señales responsables de la muerte celular son polipéptidos que pertenecen a la familia del **factor de necrosis tumoral (TNF)**. Se unen a miembros de la familia del receptor de TNF que señaliza la apoptosis en varios tipos celulares. Uno de los miembros de esta familia mejor caracterizado es el receptor de la superficie celular denominado Fas, el cual desempeña un papel importante en el control de la muerte celular en el sistema inmune. Por ejemplo, la apoptosis inducida por la activación de Fas es la responsable de la muerte de aquellas células que resultan ser una diana del sistema inmune, como por ejemplo las células cancerosas o las células infectadas por virus, así como de eliminar el exceso de linfocitos tras la respuesta inmune.

Los receptores implicados en la muerte celular generan la señal de la apoptosis activando directamente las caspasas (Fig. 13.50). El TNF y otros miembros similares de esa familia están constituidos por tres cadenas polipeptídicas idénticas, y su unión induce la trimerización del receptor. Las porciones citoplasmáticas de los receptores se unen a las moléculas adaptadoras, las cuales se unen a una primera caspasa denominada caspasa-8. Esto activa la caspasa-8 mediante autorruptura, y, entonces, las moléculas activadas de caspasa-8 pueden activar otras caspasas posteriores, iniciando de esta manera una cascada de caspasas que conduce a la muerte celular.

La caspasa-8 no rompe solamente otras caspasas, sino que también rompe un miembro de la familia de Bcl-2 denominado Bid. Bid es uno de los miembros de la familia de Bcl-2 que induce la apoptosis, en vez de proteger de la misma. Normalmente se encuentra en forma inactiva en el citosol. Sin embargo, la ruptura por la caspasa-8 permite a Bid translocarse a la mitocondria, donde altera la membrana y libera el citocromo *c* al citosol. Esto conduce a la activación de la caspasa-9, amplificando aun más la cascada de caspasas que se inició por la activación directa de la caspasa-8 mediante los receptores implicados en la muerte celular.

## *Señalización de la supervivencia celular*

La señalización mediante el TNF y otros polipéptidos relacionados es un proceso activo, en el que la activación de los receptores de muerte celular induce la apoptosis. Otras vías de señalización actúan en la dirección opuesta, promoviendo la supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis. Estas vías de señalización controlan el destino de una gran variedad de células cuya supervi-

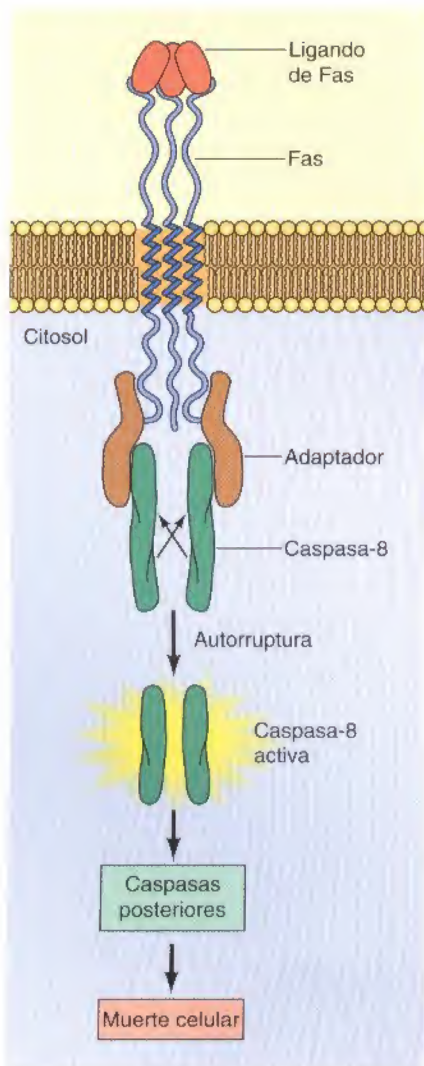


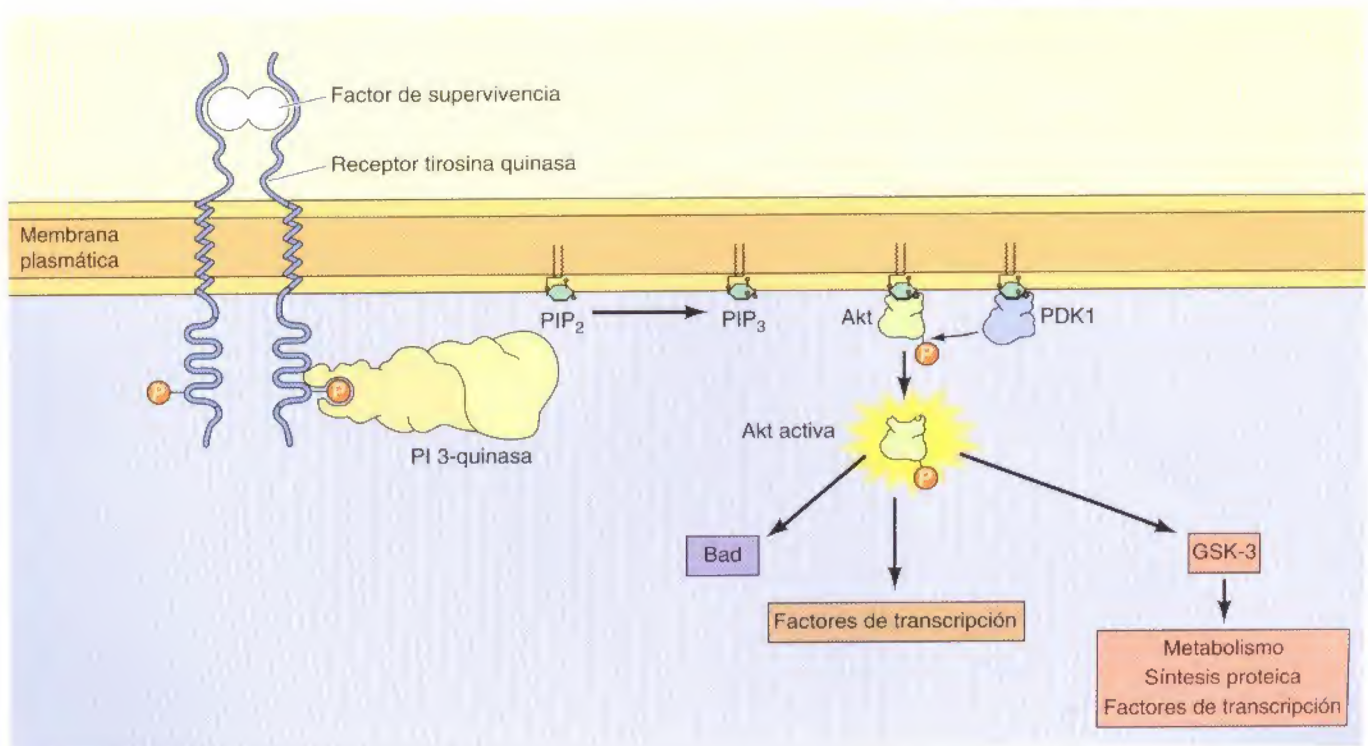

*Figura 13.50*
**Receptores implicados en la muerte celular.** La unión del ligando al receptor Fas induce la apoptosis activando directamente a la caspasa-8. El ligando de Fas está constituido por tres cadenas polipeptídicas, de tal manera que su unión induce la trimerización del receptor. Entonces, la caspasa-8 unida al receptor a través de moléculas adaptadoras se activa por autorruptura, lo que a su vez activa a caspasas posteriores y conduce a la muerte celular.

vencia depende de factores de crecimiento extracelulares o de interacciones célula-célula. Así, la mayoría de las células en los animales superiores están programadas para sufrir la apoptosis, a no ser que la muerte celular sea suprimida de manera activa por señales de supervivencia enviadas desde otras células.

Como ya se ha dicho, un ejemplo bien caracterizado de la muerte celular programada durante el desarrollo lo proporciona el sistema nervioso de los vertebrados. Aproximadamente el 50 % de las neuronas muere por apoptosis, mientras que las neuronas que han sobrevivido han recibido una cantidad suficiente de señales de supervivencia desde las células diana. Estas señales de supervivencia son factores de crecimiento polipeptídicos relacionados con el factor de crecimiento nervioso (NGF), que induce tanto la supervivencia neuronal como la diferenciación a través de la activación de un receptor proteína-tirosina quinasa. Otros tipos celulares dependen igualmente de factores de crecimiento o del contacto entre las células, lo que activa proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas con las integrinas.

Una de las principales vías de señalización intracelular responsable de estimular la supervivencia celular está iniciada por la enzima PI3-quinasa, que es activada por proteína-tirosina quinasas o por receptores acoplados a proteínas G. La PI3-quinasa fosforila al fosfolípido de membrana $PIP_2$ para formar $PIP_3$, que a su vez activa la proteína-serina/treonina quinasa Akt (ver Fig. 13.31). A continuación, Akt fosforila a un cierto número de proteínas que regulan la apoptosis (Fig. 13.51). Uno de los sustratos de Akt es un miembro de la familia Bcl-2 denominado Bad. Bad es uno de los miembros de la familia Bcl-2 (como Bid) que induce la muerte celular, estimulando la liberación de citocromo c desde la mitocondria. La fosforilación de Bad por Akt crea un sitio de unión para proteínas que secuestran a Bad en el citosol, impidiendo así su translocación a la membrana mitocondrial. Akt también fosforila a una variedad de factores de transcripción que regulan la supervivencia celular controlando la expresión de genes diana, los cuales incluyen miembros de la familia Bcl-2. Además, Akt fosforila a otra proteína quinasa (GSK-3) que afecta a la apoptosis, potencialmente regulando tanto la transcripción como la traducción de sus genes diana. Así, la vía PI3-quinasa/Akt regula

*Figura 13.51*
**Vía de la PI-3 quinasa y supervivencia celular.** Los factores de supervivencia como el NGF activan a receptores proteína-tirosina quinasas, lo que lleva a la activación de la PI-3 quinasa y a la formación de $PIP_3$. $PIP_3$ recluta la proteína quinasa Akt en la membrana plasmática, donde se activa como resultado de la fosforilación por PDK. Entonces, parece que Akt fosforila una serie de proteínas que contribuyen a la supervivencia celular. Las dianas de Akt que han sido implicadas en la supresión de la apoptosis incluyen a Bad, que es miembro de la familia de Bcl-2, a la caspasa-9, a varios factores de transcripción y a la proteína quinasa GSK-3, que afecta al metabolismo celular y a la síntesis de las proteínas.



la supervivencia celular a través de una variedad de dianas, que pueden incluir a los IAPs y sus reguladores, además de los miembros de la familia Bcl-2.

La supervivencia celular está mediada no sólo por la señalización PI3-quinasa/Akt, sino también por otras vías de señalización, incluyendo las vías Ras/Raf/ERK. Un mecanismo por el que esta vía inhibe la apoptosis, implica a la fosforilación y activación de una proteína quinasa denominada RSK por parte de ERK. Al igual que Akt, RSK fosforila al miembro de la familia Bcl-2, Bad, de modo que Bad funciona como un punto de convergencia entre las vías de PI3-quinasa/Akt y ERK en la supervivencia celular. Adicionalmente, ERK y RSK fosforilan factores de transcripción que afectan a la expresión de genes que regulan la apoptosis. Así, comprender las señales y los mecanismos que controlan la supervivencia celular sigue siendo un área de investigación con muchas cuestiones que todavía deben ser contestadas.

| PALABRAS CLAVE | RESUMEN |
|---|---|
| | **MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS Y SUS RECEPTORES** |
| **señalización endocrina, hormona, señalización paracrina, señalización autocrina** | ***Tipos de señalización célula-célula:*** La mayoría de las moléculas señalizadoras son secretadas por una célula y se unen a los receptores que se expresan en una célula diana. En general, los tipos de señalización célula-célula son tres (señalización endocrina, paracrina y autocrina) en función de la distancia que tienen que recorrer las señales. |
| **hormona esteroidea, testosterona, estrógeno, progesterona, corticosteroide, glucocorticoide, mineralocorticoide, ecdisona, brasinosteroide, hormona tiroidea, vitamina $D_3$, ácido retinoico, retinoide, superfamilia de los receptores de esteroides** | ***Hormonas esteroideas y la superfamilia de los receptores de esteroides:*** Las hormonas esteroideas, la hormona tiroidea, la vitamina $D_3$, y el ácido retinoico son moléculas hidrofóbicas pequeñas que difunden a través de la membrana plasmática de sus células diana y se unen a receptores intracelulares. Los miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides funcionan como factores de transcripción, regulando directamente la expresión génica en respuesta a la unión del ligando. |
| | ***Óxido nítrico y monóxido de carbono:*** Los gases sencillos óxido nítrico y monóxido de carbono son moléculas importantes de la señalización paracrina en el sistema nervioso y en otros tipos celulares. |
| **neurotransmisor** | ***Neurotransmisores:*** Los neurotransmisores son pequeñas moléculas hidrofílicas que transportan las señales en las sinapsis entre las neuronas o entre la neurona y otras células diana. Muchos neurotransmisores se unen a canales iónicos regulados por ligando. |
| **hormona peptídica, neuropéptido, encefalina, endorfina, neurohormona, factor de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), citoquina, factor de crecimiento unido a la membrana** | ***Hormonas peptídicas y factores de crecimiento:*** El tipo de moléculas señalizadoras más amplio y variado en los animales tienen carácter peptídico y oscilan entre unos pocos hasta más de cien aminoácidos. Este grupo de moléculas incluye a las hormonas peptídicas, a los neuropéptidos y a los factores de crecimiento. |
| **eicosanoide, prostaglandina, prostaciclina, tromboxano, leucotrieno** | ***Eicosanoides:*** Los eicosanoides son un tipo de lípidos que intervienen en la señalización paracrina y autocrina. |
| **hormona vegetal, auxina, giberelina, citoquinina, ácido abscísico, etileno** | ***Hormonas vegetales:*** Unas moléculas pequeñas, conocidas como hormonas vegetales, regulan el crecimiento y el desarrollo de la planta. |

## FUNCIONES DE LOS RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR

***Receptores asociados a proteínas G:*** La mayor familia de receptores de la superficie celular, que incluye a los receptores de muchas hormonas y neurotransmisores, transmite las señales a las dianas intracelulares a través de la acción de proteínas G.

**proteína G, receptor asociado a proteína G, proteína G heterotrimérica**

***Receptores proteína-tirosina quinasas:*** Los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento son proteína-tirosina quinasas.

**receptor proteína-tirosina quinasa, autofosforilación, dominio SH2, dominio PTB**

***Receptores de citoquinas y proteína-tirosina quinasas no receptoras:*** Los receptores para muchas citoquinas actúan en asociación con proteína-tirosina quinasas no receptoras.

**superfamilia de los receptores de citoquinas, proteína-tirosina quinasa no receptora, Src, quinasa Janus (JAK)**

***Receptores asociados a otras actividades enzimáticas:*** Otro tipo de receptores de la superficie celular incluyen a las proteína-tirosina fosfatasas, a las proteína-serina/treonina quinasas, y a las guanilato ciclasas.

**proteína-tirosina fosfatasa, factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF-$\beta$), proteína-serina/treonina quinasa, guanilato ciclasa**

## VÍAS DE TRANSDUCCIÓN INTRACELULAR DE SEÑALES

***Vía del AMPc: segundos mensajeros y la fosforilación de proteínas:*** El AMP cíclico es un segundo mensajero importante en la respuesta de las células animales a diversidad de hormonas y a moléculas olorosas. La mayoría de las acciones del AMPc están mediadas por la proteína quinasa A, que fosforila tanto a enzimas metabólicas como al factor de transcripción CREB.

**transducción intracelular de señales, AMP cíclico (AMPc), segundo mensajero, adenilato ciclasa, fosfodiesterasa de AMPc, proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A), elemento de respuesta a AMPc (CRE), CREB**

***GMP cíclico:*** El GMP cíclico también es un segundo mensajero importante en las células animales. Su papel mejor caracterizado es en la recepción visual en el ojo de vertebrados.

**GMP cíclico (GMPc), rodopsina, transducina, fosfodiesterasa de GMPc**

***Fosfolípidos y $Ca^{2+}$:*** Los fosfolípidos y el $Ca^{2+}$ son segundos mensajeros comunes, que se activan con posterioridad (*downstream*) a los receptores asociados a proteínas G y a las proteína quinasas. La hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato ($PIP_2$) da lugar al diacilglicerol y al inositol 1,4,5, trifosfato ($IP_3$) que, respectivamente, activan a la proteína quinasa C y movilizan el $Ca^{2+}$ de los reservorios intracelulares. Los niveles elevados de $Ca^{2+}$ intracelular activan varias proteínas diana, incluyendo a las proteína quinasas dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina. En las células excitables eléctricamente del músculo y del sistema nervioso, el nivel del $Ca^{2+}$ citosólico aumenta al abrirse los canales de $Ca^{2+}$ regulados por voltaje en la membrana plasmática y los receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico y endoplásmico. El $PIP_2$, además de ser hidrolizado a $IP_3$ y diacilglicerol, puede ser fosforilado dando lugar a un segundo mensajero distinto: el $PIP_3$. Esto conlleva la activación de la proteína-serina/treonina quinasa Akt, que juega un papel fundamental en la supervivencia celular.

**fosfatidil inositol 4,5 bifosfato ($PIP_2$), fosfolipasa C, diacilglicerol, inositol 1,4,5 trifosfato ($IP_3$), proteína quinasa C, éster de forbol, calmodulina, CaM quinasa, receptor de rianodina, fosfatidil inosítido (PI) 3 quinasa, fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato ($PIP_3$), Akt**

***Ras, Raf y vía de las quinasas MAP:*** La vía de las quinasas MAP es una cadena de proteína quinasas conservada, que se activa a partir de varias señales extracelulares. En las células animales, las formas mejor caracten Ras, que inicia la cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de la quinasa MAP (ERK). Entonces, ERK fosforila a varias proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo a factores de transcripción que inducen la expresión de genes tempranos inmediatos. Otras vías de las MAP quinasas median respuestas de las células de mamíferos a la inflamación y el estrés. Los componentes de las vías de las MAP quinasas están organizados por las proteínas *scaffold*, que juegan un papel importante en mantener la especificidad de la señalización de las MAP quinasas.

**quinasa MAP, ERK, Ras, Raf, MEK, factor de intercambio de nucleótidos de guanina, proteína activadora de la GTPasa, proteína pequeña de unión a GTP, gen temprano inmediato, elemento de respuesta al suero (SRE), factor de respuesta al suero (SRF), Elk-1, proteínas *scaffold***

vía JAK/STAT, proteína STAT

***Vía JAK/STAT:*** Las proteínas STAT son factores de transcripción que contienen dominios SH2, y que son activadas directamente por proteína-tirosina quinasas asociadas a receptores de citoquinas y a receptores de factores de crecimiento.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y CITOESQUELETO

FAK

***Integrinas y transducción de señales:*** La unión de las integrinas a la matriz extracelular estimula las proteína-tirosina quinasas no receptoras FAK y Src, dando lugar a la activación de la fosfolipasa C, la PI3-quinasa y las vías de señalización Ras/Raf/ERK.

Rho, Rac, Cdc42

***Regulación del citoesqueleto de Actina:*** Los factores de crecimiento inducen alteraciones en el movimiento y en la forma celular mediante la remodelación del citoesqueleto de actina. Estas alteraciones del citoesqueleto se producen a través de miembros de la subfamilia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP.

## SEÑALIZACIÓN EN EL DESARROLLO Y EN LA DIFERENCIACIÓN

***Vía del receptor tirosina quinasa/Ras/ERK en Drosophila* y *C. elegans.*** El papel de la vía Ras/Raf/quinasa MAP en el desarrollo se ha dilucidado a partir de estudios de la diferenciación de neuronas fotorreceptoras en *Drosophila* y de la inducción de la vulva en *C. elegans*.

Hedgehog, Wnt

***Hedgehog y Wnt:*** Las vías de señalización de Hedgehog y Wnt desempeñan un papel clave en la determinación del destino celular y en la generación del patrón celular tanto en los embriones de invertebrados como de los vertebrados.

Notch

***Señalización por Notch:*** La vía de Notch controla el destino celular a través de interacciones directas célula-célula durante el desarrollo animal.

## REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

muerte celular programada, apoptosis, caspasa, Bcl-2, IAP, apoptosoma

***Caspasas y apoptosis:*** La muerte celular programada desempeña un papel fundamental tanto en el mantenimiento de los tejidos adultos como en el desarrollo embrionario. A diferencia de la muerte celular accidental debido a una lesión aguda, la muerte celular programada tiene lugar mediante el proceso activo de la apoptosis. Los genes responsables de la regulación y ejecución de la apoptosis se han conservado desde *C. elegans* hasta los humanos. Estos componentes de la maquinaria de la muerte celular incluyen a una familia de proteasas (caspasas), que son los efectores de la apoptosis, así como a proteínas que regulan la activación de las caspasas. En las células de mamífero, la liberación de citocromo c desde las mitocondrias juega un papel clave en la iniciación de la activación de las caspasas.

factor de necrosis tumoral (TNF)

***Receptores implicados en la muerte celular y activación de las caspasas:*** Algunos polipéptidos secretados inducen la muerte celular programada mediante la activación de receptores que están unidos directamente a las caspasas.

***Señalización de la supervivencia celular:*** Muchas células dependen de señales de supervivencia, generadas por factores secretados o por contactos célula-célula, que suprimen la apoptosis. La vía PI3 quinasa/Akt es una vía de señalización principal, responsable de promover la supervivencia de la célula.

## Preguntas

**1.** ¿En qué se diferencia la señalización paracrina de la endocrina?

**2.** ¿Por qué la mayoría de los tipos celulares no emplean la señalización autocrina para estimular la proliferación celular?

**3.** ¿En qué difieren la señalización por moléculas señal hidrofóbicas, como las hormonas esteroídicas, de la señalización por moléculas señal hidrofílicas, como las hormonas proteicas?

**4.** ¿Cómo actúa la aspirina para reducir la inflamación y la coagulación sanguínea?

**5.** La proliferación de las células tiroideas es estimulada por hormonas que activan un receptor asociado a $G_s$. ¿Cómo afectarán los inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa a la proliferación de estas células?

**6.** El receptor de la epinefrina está asociado a $G_s$, mientras que el receptor de la acetilcolina (en las células del músculo cardiaco) está asociado a $G_i$. Supón que tienes que construir una molécula recombinante que contenga las secuencias extracelulares del receptor de la epinefrina junto a las secuencias citosólicas del receptor de la acetilcolina. ¿Qué efecto causaría la epinefrina sobre los niveles de AMPc en las células que expresen este receptor recombinante? ¿Cuál sería el efecto de la acetilcolina?

**7.** El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un dímero constituido por dos cadenas polipeptídicas. ¿Cuál sería el efecto previsto de los monómeros de PDGF en la señalización desde el receptor de PDGF?

**8.** Para intentar bloquear el crecimiento de células tumorales que expresan un receptor tirosina quinasa independiente de factores de crecimiento (uno cuya actividad intracelular es constante, incluso en ausencia de la unión de factor de crecimiento), creas una versión truncada del receptor que carece del dominio tirosina quinasa pero contiene todas las demás partes del receptor. Encuentras que no sólo tu receptor truncado es inactivo cuando se expresa en células normales, sino que también, además cuando se expresa en células tumorales, posee un efecto de dominante negativo y detiene la proliferación de dichas células. Explica estos resultados.

**9.** Explica cómo un incremento de AMPc en las células puede activar genes.

**10.** ¿Cómo afectaría la sobreexpresión de la proteína fosfatasa 1 a la inducción de genes inducibles por AMPc, en respuesta a la estimulación hormonal de las células diana apropiadas? ¿Afectaría la proteína fosfatasa 1 a la función de los canales iónicos regulados por AMPc responsables de la recepción de moléculas olorosas?

**11.** En el organismo multicelular, ¿qué ventaja se obtiene de la muerte celular por apoptosis frente a la necrosis o la lesión aguda?

**12.** ¿Cuál sería el efecto sobre las células de inyectar un complejo que forma un poro en las membranas mitocondriales externas, lo suficientemente grande como para permitir el paso de proteínas a través de las membranas?

## Bibliografía

### *Moléculas señalizadoras y sus receptores*


Arai, K., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. 1990. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783-836. [R]

Baranano, D. E. and S. H. Snyder. 2001. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10996-11002. [R]

Burgess, W. H. and T. Maciag. 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 575-606. [R]

Carpenter, G. and S. Cohen. 1990. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265: 7709-7712. [R]

Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294: 1866-1870. [R]

Denninger, J. W. and M. A. Marletta. 1999. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 334-350. [R]

Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875. [R]

Jessell, T. M. and E. R. Kandel. 1993. Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72/*Neuron* 10 (Suppl.): 1-30. [R]

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162. [R]

Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Sch9Ftz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 835-839. [R]

Massagu8E, J. and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 515-541. [R]

Mayer, B. and B. Hemmens. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22: 477-481. [R]

McCarty, D. R. and J. Chory. 2000. Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103: 201-209. [R]

McDonnell, D. P. and J. D. Norris. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 1642-1644. [R]

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474. [R]

Ross, R., E. W. Raines and D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169. [R]

Sheen, J. 2002. Phosphorelay and transcriptional control in cytokinin signal transduction. *Science* 296: 1650-1652. [R]

Smalley, W. and R. N. DuBois. 1997. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv. Pharmacol.* 39: 1-20. [R]

Snyder, S. H., S. R. Jaffrey and R. Zakhary. 1998. Nitric oxide and carbon monoxide: Parallel roles as neural messengers. *Brain Res. Rev.* 26: 167-175. [R]

Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683. [R]

Thummel, C. S. and J. Chory. 2002. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes Dev.* 16: 3113-3129. [R]


### *Funciones de los receptores de la superficie celular*


Aaronson, D. S. and C. M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296: 1653-1655. [R]

Attisano, L. and J. L. Wrana. 2002. Signal trans duction by the TGF-$\beta$ superfamily. *Science* 296: 1646-1647. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355-365. [R]

Burke, D., D. Wilkes, T. L. Blundell and S. Malcolm. 1998. Fibroblast growth factor re ceptors: Lessons from the genes. *Trends Biochem. Sci.* 23: 59-62. [R]

Hubbard, S. R., M. Mohammadi and J.

Schlessinger. 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 11987-11990. [R]
Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1311-1315. [P]
Massagué, J., S. W. Blain, and R. S. Lo. 2000. TGF-$\beta$ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309. [R]
Mombaerts, P. 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286: 707-711. [R]
Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. [R]
Rodbell, M. 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284: 17-22. [R]
Sasaki, T., J. Sasaki-Irie and J. M. Penninger. 2001. New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 1041-1046. [R]
Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225. [R]
Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110: 669-672. [R]
Singer, A. L. and G. A. Koretsky. 2002. Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science* 296: 1639-1640. [R]
Thomas, S. M. and J. S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 513-609. [R]
Watowich, S. S., H. Wu, M. Socolovsky, U. Klingmuller, S. N. Constantinescu and H. F. Lodish. 1998. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 91-128. [R]
Wedel, B. and D. Garbers. 2001. The guanylyl cyclase family at Y2K. *Ann. Rev. Physiol.* 63: 215-233. [R]

### *Vías de transducción intracelular de señales*

Aaronson, D. S. and C. M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296: 1653-1655. [R]
Brivanlou, A. H. and J. E. Darnell Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-818. [R]
Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657. [R]
Chang, L. and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40. [R]
Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80: 259-268. [R]
Cohen, P. T. W. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: Variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* 22: 245-251. [R]
Corcoran, E. E. and A. R. Means. 2001. Defining $Ca^{2+}$/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975-2978. [R]
Darnell, J. E. Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635. [R]
Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 290-2927. [R]
Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252. [R]
Dhillon, A. S. and W. Kolch. 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 404: 3-9. [R]
Divecha, N. and R. F. Irvine. 1995. Phospholipid signaling. *Cell* 80: 269-278. [R]
Hill, C. S. and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211. [R]
Houslay, M. D. and G. Milligan. 1997. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* 22: 217-224. [R]
Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236. [R]
Hurley, J. H. 1999. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274: 7599-7602. [R]
Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912. [R]
Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter and H. R. De Jonge. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 307-312. [R]
Lowy, D. R. and B. M. Willumsen. 1993. Function and regulation of Ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 851-891. [R]
Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934. [R]
Montminy, M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 807-823. [R]
Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. [R]
Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614. [R]
O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber. 2002. Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109: S121-S131. [R]
Pawson, T. and J. D. Scott. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080. [R]
Ree, S. G. and Y. S. Bae. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 5045-15048. [R]
Scheid, M. P. and J. R. Woodgett. 2001. PKB/Akt: Functional insights from genetic models. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 760-768. [R]
Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg. 1999. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 821-861. [R]
Soderling, T. R. 1999. The Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.* 24: 232-236. [R]
Stryer, L. 1991. Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* 266: 10711-10714. [R]
Taylor, C. W. 2002. Controlling calcium entry. *Cell* 111: 767-769. [R]
Toker, A. and A. C. Newton. 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188. [R]
Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma and D. L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell. Biol.* 4: E263-272. [R]
Vojtek, A. B. and C. J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 19925-19928. [R]
Yarfitz, S. and J. B. Hurley. 1994. Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 269: 14329-14332. [R]

### *Transducción de señales y citoesqueleto*

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032. [R]
Etienne-Manneville, S. and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635. [R]
Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687. [R]
Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83-E90. [R]
Nobles, C. D. and A. Hall. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53-62. [P]
Ridley, A. J. 2001. Rho family proteins: coordinating cellular responses. *Trends Cell Biol.* 11: 471-47. [R]
Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature Cell Biol.* 4: E65-E68. [R]

### *Señalización en el desarrollo y en la diferenciación*

Allman, D., J. A. Punt, D. J. Izon, J. C. Aster and W. S. Pear. 2002. An invitation to T and more: Notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* 109: S1-S11. [R]
Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776. [R]
Bray, S. and M. Furriois. 2001. Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Curr. Biol.* 11: R217-R221. [R]
Dickson, B. 1995. Nuclear factors in Sevenless signalling. *Trends Genet.* 11: 106-111. [R]
Ingham, P. W. 2001. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* 294: 1879-1881. [R]
Kalderon, D. 2002. Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 12: 523-531. [R]
Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through $\beta$-catenin. *Science* 296: 1644-1646. [R]
Simon, M. A. 2000. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103: 13-15. [R]
Sternberg, P. W. and M. Han. 1998. Genetics

of RAS signaling in *C. elegans*. *Trends Genet*. 14: 466-472. [R]

Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]

Thomas, B. J. and D. A. Wassarman. 1999. A fly's eye view of biology. *Trends Genet*. 15: 184-190. [R]

Wang, M. and P. W. Sternberg. 2001. Pattern formation during *C. elegans* vulval induction. *Curr. Top. Dev. Biol*. 51: 189-220. [R]

Wodarz, A. and R. Nusse. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*. 14: 59-88. [R]

Zipursky, S. L. and G. M. Rubin. 1994. Determination of neuronal cell fate: Lessons from the R7 neuron of *Drosophila*. *Ann. Rev. Neurosci*. 17: 373-397. [R]


### *Regulación de la muerte celular programada*


Adams, J. M. and S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci*. 26: 61-66. [R]

Adrain, C. and S. J. Martin. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci*. 26: 390-397. [R]

Ashkenazi, A. and V. M. Dixit. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308. [R]

Brunet, A., S. R. Datta and M. E. Greenberg. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt pathway. *Curr. Opin. Neurobiol*. 11: 297-305. [R]

Chen, G. and D. V. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635. [R]

Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev*. 13: 290-2927. [R]

Frame, S. and P. Cohen. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J*. 359: 1-16. [R]

Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13: 1899-1911. [R]

Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776. [R]

Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354. [R]

Martin, S. J. 2002. Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. *Cell* 109: 793-796. [R]

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365. [R]

Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9: 459-470. [R]

Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254. [R]

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636. [R]

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15: 2922-2933. [R]

# 14 Ciclo celular



LA CAPACIDAD DE AUTORREPRODUCIRSE PROBABLEMENTE SEA LA CARACTERÍSTICA FUNDAMENTAL de las células —al igual que podría decirse de los seres vivos—. Todas las células se reproducen mediante su división en dos, cada célula parental dando lugar a dos células hijas al final de cada ciclo de división celular. Estas células hijas, a su vez pueden crecer y dividirse, dando lugar a una población celular a partir del crecimiento y la división de una única célula parental y de su progenie. En el caso más sencillo, estos ciclos de crecimiento y división permiten a una única bacteria, tras la incubación, durante una noche, en una placa de agar con medio provisto de nutrientes, formar una colonia constituida por una progenie de millones de células. En un caso más complejo, ciclos repetidos de crecimiento y división celular suponen el desarrollo de una célula huevo fecundada, dando lugar a las más de $10^{13}$ células que componen el cuerpo humano.

La división de todas las células ha de ser finamente regulada y coordinada con el crecimiento celular y con la replicación del ADN, para asegurar la formación de una progenie de células que contengan sus genomas completos. En las células eucariotas, la progresión a lo largo del ciclo celular la controla una serie de proteína quinasas que se han conservado desde las levaduras hasta los mamíferos. En los eucariotas superiores, esta maquinaria del ciclo celular a su vez está regulada por los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular, lo que permite coordinar la división de las células individuales con las necesidades del organismo como un todo. No debe extrañar que las alteraciones en la regulación del ciclo celular sean una causa frecuente de la proliferación anormal de las células cancerosas; por tanto, los estudios acerca del ciclo celular y del cáncer se han solapado, de igual manera que están relacionados los estudios acerca del cáncer y de las vías de señalización celular como se vio en el Capítulo 13.

## Ciclo celular eucariota

El ciclo de la división de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular. En las bacterias, el crecimiento celular y la replicación del ADN tienen lugar durante la mayor parte del ciclo celular, y los cromosomas duplicados se distribuyen a las células hijas asociados a la membrana plasmática. Sin embargo, en los eucariotas el ciclo celular es más complejo y consiste en cuatro fases diferenciadas. Aunque el crecimiento celular suele ser un proceso continuo, el ADN se sintetiza sólo du-

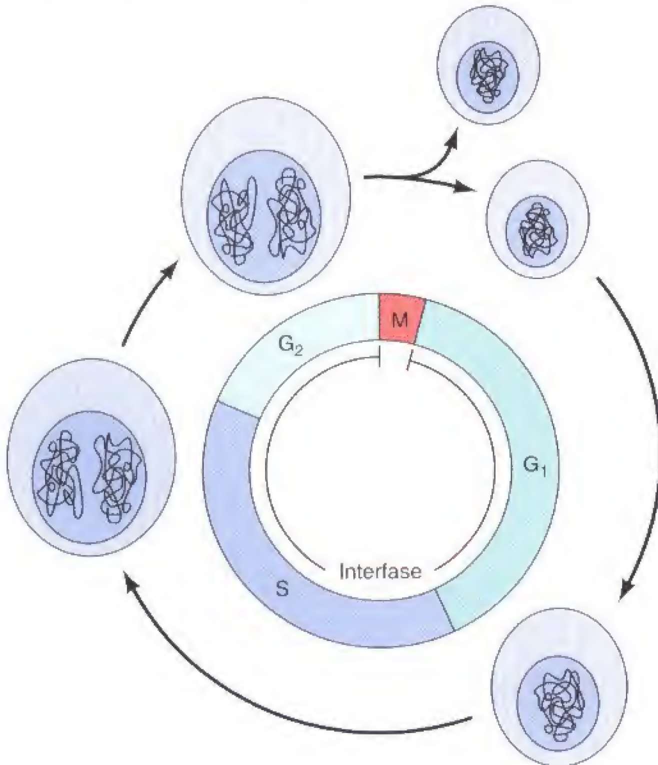
rante una fase del ciclo celular y, entonces, los cromosomas replicados se distribuyen a los núcleos hijos mediante una compleja serie de procesos que preceden a la división celular. La progresión a través de estas etapas del ciclo celular está controlada mediante un sistema regulador conservado, que no sólo coordina los diferentes procesos del ciclo celular sino que también acopla el ciclo celular con las señales extracelulares que controlan la proliferación celular.

## *Fases del ciclo celular*

Un ciclo celular eucariota típico es el de las células humanas en cultivo, que se dividen aproximadamente cada 24 horas. Visto al microscopio, el ciclo celular se divide en dos etapas fundamentales: **mitosis** e **interfase**. La mitosis (división del núcleo) es la etapa más llamativa del ciclo, que corresponde a la separación de los cromosomas hijos y termina, generalmente, en la división celular (**citocinesis**). Sin embargo, la mitosis y la citocinesis duran cerca de una hora por lo que aproximadamente el 95 % del ciclo celular transcurre en la interfase —el intervalo entre dos mitosis—. Durante la interfase los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. Sin embargo, a nivel molecular, en la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del ADN de manera sucesiva, lo que deja a la célula preparada para la división.

La célula crece a un ritmo continuado durante la interfase, y la mayoría de las células duplican su tamaño entre una mitosis y la siguiente. En cambio, el ADN sólo se sintetiza durante una parte de la interfase. Así, la duración de la síntesis del ADN divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas (Fig. 14.1). La **fase M** del ciclo corresponde a la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. A esta fase le sigue la **fase $G_1$** (*gap1*), que corresponde al intervalo (*gap*) entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN. Durante $G_1$ la célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN. Seguidamente tiene lugar la **fase S** (síntesis), durante la que se produce la replicación del ADN. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la **fase $G_2$**, durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis.

*Figura 14.1*
**Fases del ciclo celular.** El ciclo de división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, $G_1$, S y $G_2$. A la fase M (mitosis) le suele seguir la citocinesis. La fase S es el periodo durante el que tiene lugar la replicación del ADN. La célula crece durante la interfase, que incluye a las fases $G_1$, S y $G_2$. La duración de las fases del ciclo celular que se muestran aquí es característica de las células de proliferación rápida de mamífero.




La duración de estas fases del ciclo celular varía considerablemente según los distintos tipos de células. Para una célula de proliferación rápida humana típica, con una duración total del ciclo de 24 horas, la fase $G_1$ dura unas 11 horas, la fase S unas 8 horas, $G_2$ cerca de 4 horas y M una hora, aproximadamente. Sin embargo, otros tipos celulares pueden dividirse más rápidamente. Las levaduras en gemación, por ejemplo, atraviesan las cuatro fases del ciclo celular sólo en unos 90 minutos. Incluso, en células embrionarias tempranas tras la fecundación del óvulo tienen lugar ciclos celulares más cortos (30 minutos o menos) (Fig. 14.2). Pero en este caso no se produce crecimiento celular. Por el contrario, mediante estos ciclos celulares en el embrión temprano el citoplasma del huevo se divide rápidamente en células más pequeñas. En estos ciclos celulares en el embrión temprano no hay fase $G_1$ ni $G_2$, y el ADN se replica rápidamente, por lo que consisten en fases S muy cortas alternando con fases M.

A diferencia de la rápida proliferación en las células embrionarias, algunas células del animal adulto cesan por completo su división (p. ej., las células nerviosas) y muchas otras células sólo se dividen ocasionalmente, cuando es necesario reemplazar la pérdida de las células debi-

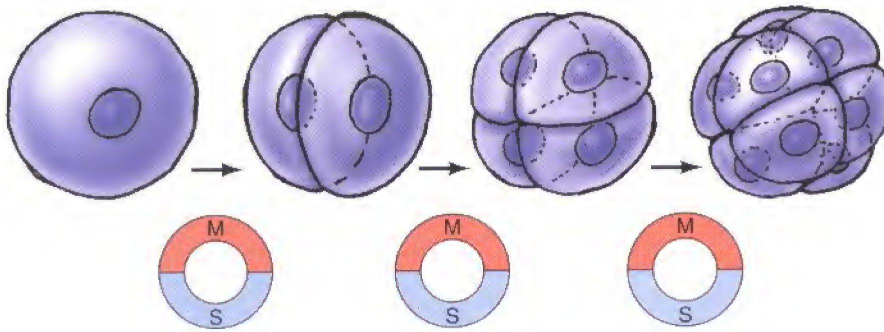



*Figura 14.2*
**Ciclos de las células embrionarias.** Los ciclos de las células embrionarias tempranas dan lugar a la división rápida del citoplasma del huevo en células más pequeñas. Las células no crecen durante estos ciclos, los cuales carecen de $G_1$ y de $G_2$, y consisten simplemente en la alternancia de cortas fases S con fases M.

do a una lesión o a la muerte celular. Entre este último tipo de células se incluyen a los fibroblastos de la piel, así como a las células de muchos órganos internos, como el hígado, el riñón y el pulmón. Como se tratará más adelante en la sección siguiente, estas células salen de $G_1$ para entrar en un estado de reposo del ciclo denominado **$G_0$**, en el que permanecen activas metabólicamente pero no proliferan a no ser que sean requeridas para ello mediante las señales extracelulares apropiadas.

El análisis del ciclo celular requiere que las células se identifiquen en las diferentes etapas indicadas anteriormente. Aunque las células mitóticas se pueden distinguir al microscopio, las células en las otras fases del ciclo ($G_1$, S y $G_2$) han de ser identificadas mediante criterios bioquímicos. Las células en la fase S pueden identificarse fácilmente porque incorporan timidina radiactiva, la cual se usa exclusivamente en la síntesis del ADN (Fig. 14.3). Por ejemplo, si una población de células humanas en cultivo, que proliferan rápidamente, se expone a timidina radiactiva durante un periodo corto de tiempo (p. ej., 15 minutos) y a continuación se analiza por autorradiografía, se encontrará que cerca de la tercera parte de las células están marcadas radiactivamente, lo que correspondería a la fracción de células en fase S.

También se pueden utilizar variantes de estos experimentos de marcaje celular para determinar la duración de las diferentes etapas del ciclo celular. Por ejemplo, consideremos un experimento en el que las células se exponen a timidina radiactiva durante 15 minutos, tras lo cual se retira la timidina radiactiva y se cultivan las células durante diferentes intervalos de tiempo antes de realizar la autorradiografía. Las células interfásicas marcadas radiactivamente, que se

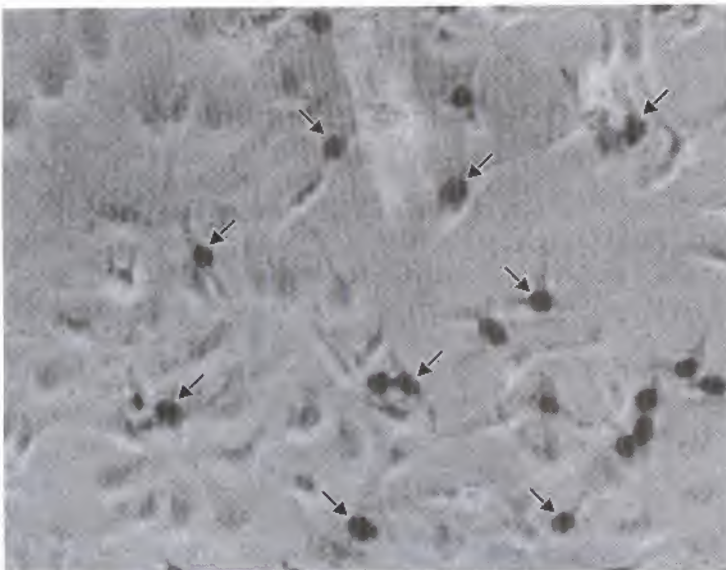


*Figura 14.3*
**Identificación de células en fase S mediante la incorporación de timidina radiactiva.** Las células fueron expuestas a timidina radiactiva y se analizaron por autorradiografía. Las flechas indican las células marcadas. (A partir de D.W. Stacey et al., 1991. *Mol. Cell Biol.* 11: 4.053.)

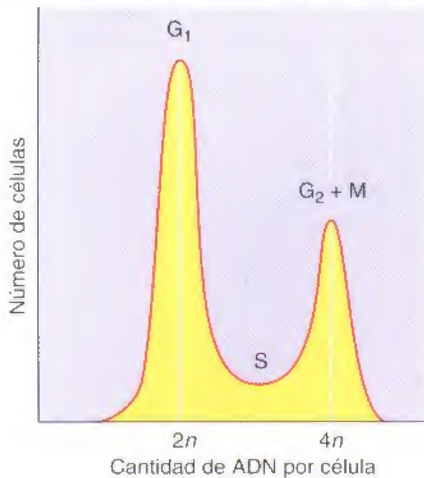



*Figura 14.4*
**Determinación de la cantidad de ADN celular.** Una población de células se marca con una tinción fluorescente que se une al ADN. Entonces se hace pasar a las células por un citofluorímetro de flujo, que mide la intensidad de la fluorescencia en las células individuales. Los datos se representan como el número de células frente a la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN. La distribución muestra dos picos, que corresponden a las células con un contenido de ADN de 2*n* y de 4*n*; estas células están en las fases $G_1$ y $G_2$/M del ciclo, respectivamente. Las células en la fase S tienen una cantidad de ADN entre 2*n* y 4*n*, y se distribuyen entre los dos picos.

hubieran encontrado en fase S durante el tiempo que duró la exposición a timidina radiactiva, se observarán durante varias horas, mientras avanzan a través del resto de la fase S y de la fase $G_2$. Sin embargo, no se observarán células mitóticas marcadas radiactivamente hasta 4 horas después del marcaje. Este lapso de 4 horas corresponde a la duración de $G_2$ —el tiempo mínimo que se requiere para que una célula que incorporó la timidina radiactiva al final de la fase S entre en mitosis.

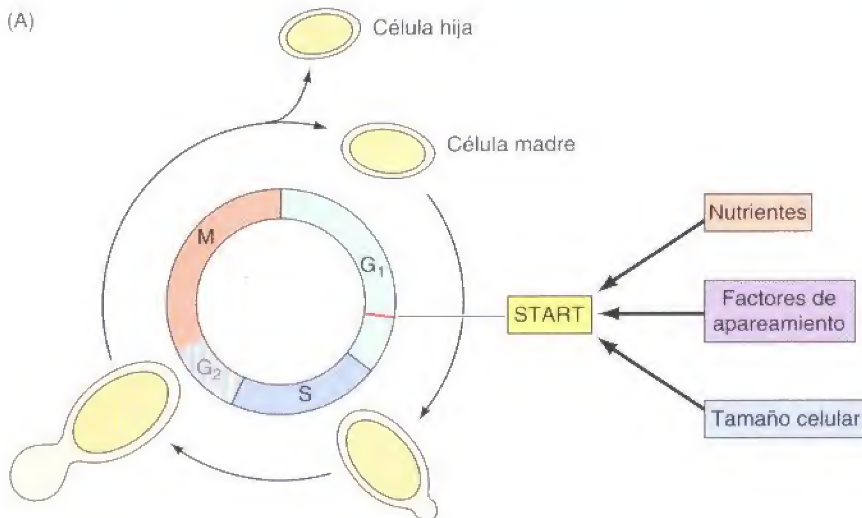
También se pueden distinguir las células en las diferentes etapas del ciclo celular en función de su cantidad de ADN (Fig. 14.4). Por ejemplo, las células animales en $G_1$ son diploides (contienen dos copias de cada cromosoma), por lo que se dice que su cantidad de ADN es 2*n* (se designa por *n* al contenido de ADN haploide en el genoma). Durante la fase S, mediante la replicación se aumenta la cantidad de ADN de la célula de 2*n* a 4*n*, por lo que las células en fase S tendrán una cantidad de ADN entre 2*n* y 4*n*. El contenido de ADN se mantiene en 4*n* en las células en $G_2$ y en M, y se reduce a 2*n* tras la citocinesis. La cantidad de ADN celular se puede determinar experimentalmente incubando las células con una tinción fluorescente que se una al ADN, y posteriormente analizando la intensidad de la fluorescencia en las células individuales por **citometría de flujo** o mediante un **separador celular de fluorescencia**; de esta manera se distinguen las células en las fases $G_1$, S y $G_2$ /M del ciclo celular.

## *Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares*

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular. Un ejemplo de la regulación del ciclo celular por señales extracelulares lo proporciona el efecto de los factores de crecimiento sobre la proliferación de las células animales. Además, diversos procesos celulares como el crecimiento celular, la replicación del ADN y la mitosis, han de coordinarse durante el transcurso del ciclo celular. Esto se consigue mediante una serie de puntos de control que regulan la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular.

Uno de los puntos de regulación principales del ciclo celular, en muchos tipos celulares, se encuentra avanzada la fase $G_1$ y controla el paso de $G_1$ a S. Este punto de regulación se definió por primera vez en estudios de la levadura de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*), donde se le conoce como **START** (Fig. 14.5). Una vez que las células han rebasado el START, quedan determinadas a entrar en la fase S y a sufrir un ciclo de división celular. Sin embargo, rebasar el punto START es un proceso que está finamente regulado en el ciclo celular de la levadura, siendo controlado a través de señales externas, como la disponibilidad de nutrientes, y por el tamaño celular. Por ejemplo, si las levaduras se enfrentan a una carencia de nutrientes, paran su ciclo celular en START y entran en un estado de reposo en vez de proseguir a la fase S. Así, START supone un punto de decisión en el que la célula determina si hay suficientes nutrientes disponibles para avanzar a través del resto del ciclo celular. Los factores polipeptídicos que intervienen como señales para el apareamiento de las levaduras también detienen el ciclo celular en START, lo que permite fusionarse a las células de levadura haploides en vez de proseguir a la fase S.

Además de servir como un punto de decisión para supervisar señales extracelulares, START es el punto en el que se coordina el crecimiento de la célula con la replicación del ADN y con la división celular. La importancia de esta regulación se muestra de manera evidente en las levaduras de gemación, en las que la división celular da lugar a una progenie de células de distintos tamaños: una célula madre grande y una célula hija pequeña. Para que las células de la levadura mantengan un tamaño constante, la célula hija pequeña debe crecer hasta alcanzar un tamaño mayor al de la célula madre, antes de volver a dividirse. Por



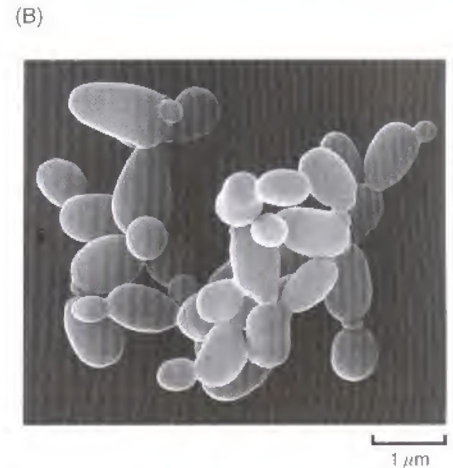




*Figura 14.5*
**Regulación del ciclo celular de la levadura de gemación.** (A) El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* se regula principalmente en un punto de la fase $G_1$ avanzada, denominado START. El paso por START está controlado por la disponibilidad de nutrientes, de factores de apareamiento y por el tamaño celular. Cbe destacar que estas levaduras se dividen por gemación. Las yemas se generan justo después de START y continúan creciendo hasta que se separan de la célula madre tras la mitosis. La célula hija que se forma a partir de la yema es más pequeña que la célula madre y, por tanto, requiere más tiempo para crecer durante la fase $G_1$ del siguiente ciclo celular. Aunque las fases $G_1$ y S tienen lugar de manera normal, el huso mitótico comienza a formarse durante la fase S, por lo que el ciclo celular de la levadura de gemación carece de una fase $G_2$ diferenciada. (B) Micrografía al microscopio electrónico de barrido de *S. cerevisiae*. El tamaño de la yema refleja la situación de la célula en el ciclo. (B, David M. Philips/Visuals Unlimited.)

lo tanto, se ha de controlar el tamaño de la célula para poder coordinar el crecimiento celular con los otros procesos del ciclo celular. Esta regulación se realiza mediante un mecanismo de control que requiere que la célula alcance un tamaño mínimo para poder rebasar el START. Por lo tanto, la célula hija pequeña pasa más tiempo en $G_1$ y crece más que la célula madre.

La proliferación de la mayoría de las células animales también se regula en la fase $G_1$ del ciclo celular. Concretamente, un punto de decisión de la $G_1$ avanzada, denominado **punto de restricción** en las células animales, funciona de manera análoga a como lo hace START en las levaduras (Fig. 14.6). Sin embargo, a diferencia de las levaduras, el paso de las células animales a través del ciclo celular se regula, principalmente, por factores de crecimiento extracelulares que son señales de proliferación celular, en vez de por la disponibilidad de nutrientes. En presencia de los factores de crecimiento apropiados, las células atraviesan el punto de restricción y entran en la fase S. Una vez que la célula ha rebasado el punto de restricción, queda determinada a proseguir a través de la fase S y del resto del ciclo celular, incluso en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. Por otro lado, si los factores de crecimiento adecuados no están disponibles en $G_1$, la progresión a través del ciclo celular se para en el punto de restricción. La célula entra en un estado en reposo del ciclo celular denominado $G_0$ en el que puede permanecer indefinidamente sin proliferar. Las células en $G_0$ son metabólicamente activas aunque cesa su crecimiento y su ritmo de síntesis de las proteínas es menor. Como ya se ha comentado, muchas células en los animales permanecen en $G_0$ hasta que son inducidas a proliferar por los factores de crecimiento apropiados o por otras señales extracelulares. Por ejemplo, los fibroblastos de la piel se mantienen detenidos en $G_0$ hasta que se les estimula a dividirse para reparar el daño causado por una herida. La proliferación de estas células se activa por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, que es liberado por las plaquetas de la sangre durante la coagulación sanguínea y actúa como una señal para la proliferación de los fibroblastos en la proximidad del tejido dañado.

Aunque la proliferación de la mayoría de las células se regula en $G_1$, algunos ciclos celulares se controlan, en cambio, en $G_2$. Un ejemplo de esto es el ciclo

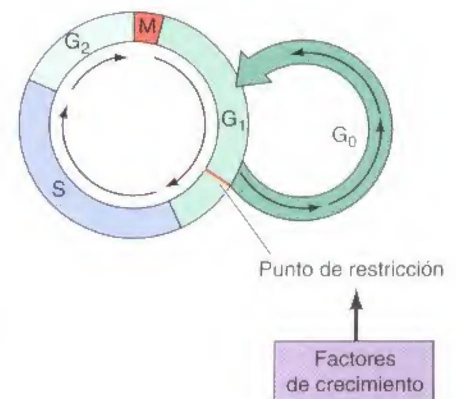



*Figura 14.6*
**Regulación del ciclo de las células animales por factores de crecimiento.** La disponibilidad de factores de crecimiento controla el ciclo de la célula animal en un punto de la fase $G_1$ avanzada, denominado punto de restricción. Si los factores de crecimiento no están disponibles durante $G_1$, las células entran en un estado en reposo del ciclo denominado $G_0$.

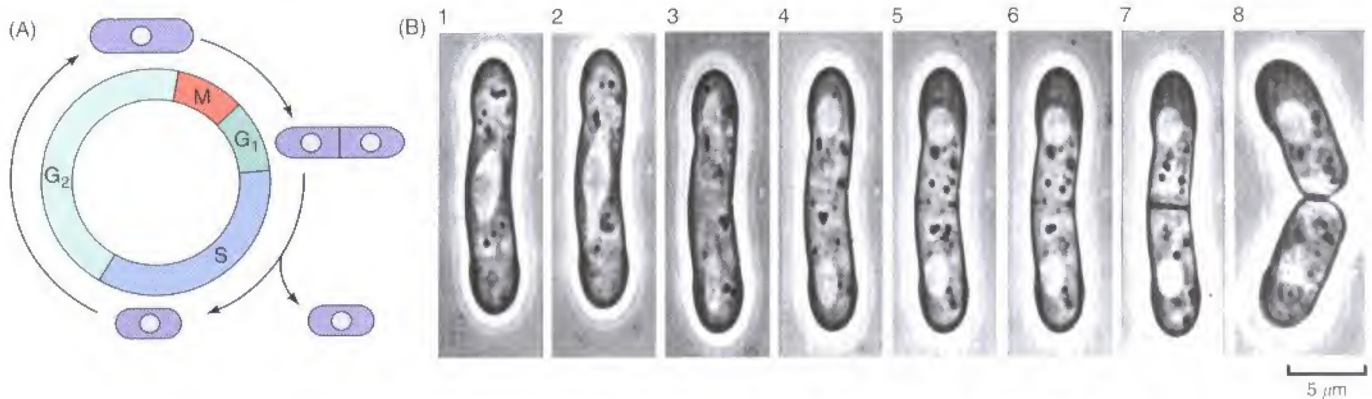



*Figura 14.7*
**Ciclo celular de la levadura de fisión.** (A) Las levaduras de fisión crecen por sus extremos, y se dividen formando una pared que atraviesa la zona media de la célula. A diferencia del ciclo de las levaduras de gemación, el ciclo celular de las levaduras de fisión tiene fases $G_1$, S, $G_2$ y M normales. Cabe destacar que la citocinesis tiene lugar en $G_1$. La longitud de la célula indica su situación en el ciclo. (B) Micrografías al microscopio óptico que muestran sucesivos estadios de la mitosis y de la citocinesis. (B, cortesía de C.F. Robinow, University of Western Ontario.)

celular de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Fig. 14.7). A diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, el ciclo celular de *S. pombe* se regula básicamente a través del control del paso de $G_2$ a M, que es el punto principal en el que es supervisado el tamaño celular y la disponibilidad de nutrientes. En los animales, el ejemplo más característico de control del ciclo celular en $G_2$ lo proporcionan los oocitos. Los oocitos de los vertebrados pueden permanecer detenidos en $G_2$ durante largos períodos de tiempo (varias décadas en el ser humano) hasta que se activa su paso a la fase M, por la estimulación hormonal. De esta manera, las señales extracelulares pueden controlar la proliferación celular regulando el paso de las fases $G_2$ a M así como de $G_1$ a S del ciclo celular.

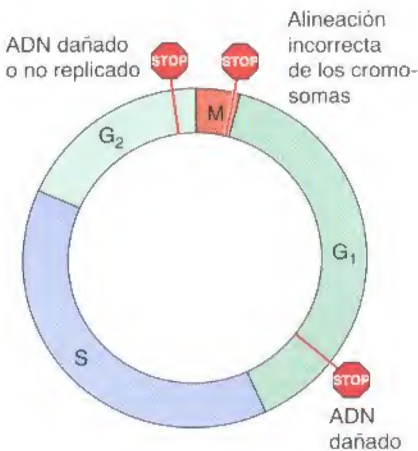
## Puntos de control del ciclo celular

Los mecanismos de control tratados en la sección anterior regulan la progresión del ciclo celular en respuesta al tamaño celular y a señales extracelulares, como los nutrientes o los factores de crecimiento. Pero además, los sucesos que tienen lugar durante las diferentes etapas del ciclo celular han de coordinarse entre sí de tal manera que ocurran en el orden adecuado. Por ejemplo, es de la mayor importancia que la célula no entre en mitosis hasta que haya finalizado la replicación del genoma. De lo contrario se produciría una división celular desastrosa, en la que las células hijas no heredarían una copia completa del material genético. En la mayoría de las células, esta coordinación entre las diferentes fases del ciclo celular depende de un sistema **puntos de control** que previenen la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente hayan sido completados.

Varios puntos de control del ciclo celular funcionan para asegurar que los cromosomas incompletos o dañados no sean replicados y transmitidos a las células hijas (Fig. 14.8). Estos puntos de control detectan el ADN no replicado o dañado y coordinan la progresión del ciclo celular con la compleción de la replicación o reparación del ADN. Por ejemplo, el punto de control en $G_2$ previene la iniciación de la mitosis hasta que se haya completado la replicación del ADN. Este punto de control en $G_2$ detecta al ADN sin replicar, lo que genera una señal que da lugar a la detención del ciclo celular. Por lo tanto, la operación del punto de control en $G_2$ previene la iniciación de la fase M antes de la compleción de la fase S, de modo que las células permanecen en $G_2$ hasta que el genoma se haya replicado por completo. Sólo entonces se alivia la inhibición de la progresión en $G_2$, permitiendo a la célula iniciar la mitosis y distribuir los cromosomas completamente replicados entre las células hijas. Además de detectar el ADN no replicado, el punto de control en $G_2$ detecta el ADN dañado, como el resultante de la radiación. Si se detecta daño del ADN, la detención en el punto de control proporciona el tiempo necesario para la reparación del daño, en lugar de transmitirse a las células hijas.

El ADN dañado no sólo detiene el ciclo celular en $G_2$, sino también en puntos de control en las fases $G_1$ y S. La detención en el punto de control de $G_1$ permite

*Figura 14.8*
**Puntos de control del ciclo celular.** Varios puntos de control funcionan para asegurar que los genomas completos se transmiten a las células hijas. Un punto de control fundamental detiene las células en $G_2$ en respuesta al ADN dañado o que no haya sido replicado. La presencia de ADN dañado también provoca que el ciclo celular se detenga en un punto de control en $G_1$. Otro punto de control en la fase M detiene la mitosis si los cromosomas no están correctamente alineados en el huso mitótico.



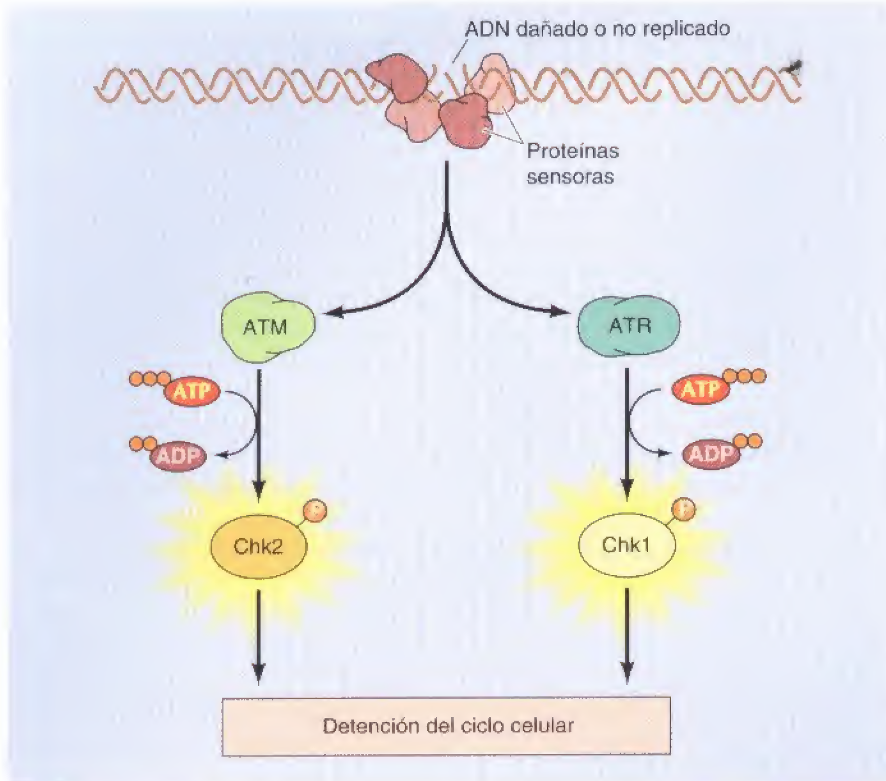



*Figura 14.9*
**Detencion del ciclo celular en los puntos de control de $G_1$, S y $G_2$.** Un complejo de proteínas sensoras se une al ADN dañado o no replicado y activan a las proteína quinasas ATM y ATR. ATM y ATR a su vez fosforilan y activan a las proteína quinasas Chk2 y Chk1, respectivamente, dando lugar a la detención del ciclo celular.

la reparación antes de que la célula entre en la fase S, en la que se replicaría el ADN dañado. El punto de control de la fase S proporciona una monitorización continua de la integridad del ADN, para asegurar que el ADN dañado es reparado antes de su replicación. Además, el punto de control de la fase S proporciona un monitor del control de calidad, que estimula la reparación de cualquier error que pueda ocurrir durante la replicación del ADN, como la incorporación de bases incorrectas o la replicación incompleta de segmentos de ADN.

La detención del ciclo celular en los puntos de control de $G_1$, S, y $G_2$ está iniciada por un complejo de proteínas que se unen al ADN dañado o sin replicar (Fig. 14.9). Estas proteínas (que todavía no están completamente caracterizadas) son los sensores del ADN dañado, y sirven para activar una vía de señalización que desencadena no sólo la detención del ciclo celular, sino también la activación de la reparación del ADN y, en algunos casos, la muerte celular programada. Las dianas inmediatas de las proteínas sensoras son dos proteínas quinasas relacionadas, denominadas ATM y ATR, que se activan en respuesta al ADN dañado. Estas proteínas fueron identificadas inicialmente porque las mutaciones en el gen que codifica a ATM son responsables de la enfermedad ataxia telangiectasia, que resulta en defectos en los sistemas nervioso e inmunológico, además de una elevada frecuencia de cáncer en los individuos afectados. Después, ATR fue identificada como una proteína estrechamente relacionada con ATM. Una vez activadas, ATM y ATR fosforilan y activan a las quinasas Chk2 y Chk1, respectivamente. Chk1 y Chk2, a su vez fosforilan a componentes del aparato regulador del ciclo celular, estudiado en la siguiente sección de este capítulo, para detener la progresión del ciclo celular.

En las células de mamífero, la detención en el punto de control de $G_1$ está mediada por la acción de una proteína adicional conocida como **p53**, que es fosforilada por ATM además de por Chk2 (Fig. 14.10). La fosforilación estabiliza a p53, que de otro modo es degradada rápidamente, resultando en un aumento rápido en los niveles de p53 en respuesta al ADN dañado. La proteína p53 es un factor de transcripción, y la elevación de su expresión desencadena la inducción de genes diana que inducen la detención del ciclo celular. Hay que subra-

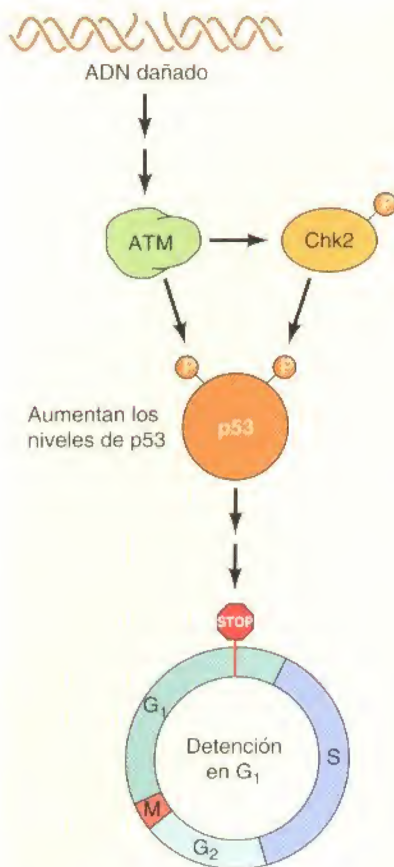



*Figura 14.10*
**Papel de p53 en la detención en $G_1$.** La proteína p53 juega un papel clave en la detención del ciclo celular en el punto de control $G_1$. La fosforilación por ATM y Chk2 estabiliza a p53, resultando en un incremento rápido de los niveles de p53 en respuesta al ADN dañado. La proteína p53 a continuación induce la expresión de genes que desencadenan la detención del ciclo celular.

yar que el gen que codifica para p53 frecuentemente se encuentra mutado en cánceres humanos. La pérdida de la función de p53 como resultado de estas mutaciones, impide la detención en $G_1$ en respuesta al ADN dañado, de modo que es replicado y transmitido a las células hijas, en lugar de ser reparado. La herencia de este ADN dañado resulta en una elevación de la frecuencia de mutaciones y de la inestabilidad general del genoma celular, lo que contribuye al desarrollo del cáncer. Las mutaciones del gen de *p53* son la alteración genética más común en los cánceres humanos (véase Cap. 15), lo que ilustra la importancia crítica de la regulación del ciclo celular para la vida de los organismos multicelulares.

Otro punto de control importante del ciclo celular, que mantiene la integridad del genoma, se localiza al final de la mitosis (véase Fig. 14.8). Este punto de control supervisa que los cromosomas se alineen de manera correcta en el huso mitótico, lo que asegura que se distribuya un juego completo de cromosomas a cada célula hija. Por ejemplo, la alineación incorrecta de uno o más cromosomas en el huso mitótico provoca que la mitosis se detenga en la metafase, antes de la segregación de los cromosomas recién replicados a los núcleos de las células hijas. Gracias a este punto de control, los cromosomas no se segregan hasta que se disponga de un juego completo de cromosomas para ser distribuido a cada célula hija.

## *Restringir la replicación del ADN a una vez por ciclo celular*

El punto de control de $G_2$ impide la iniciación de la mitosis antes de la compleción de la fase S, asegurando así que el ADN replicado incompletamente no se transmita a las células hijas. También es importante asegurar que el genoma sólo se replica una vez en cada ciclo celular. Así, una vez que un segmento de ADN ha sido replicado durante la fase S, deben existir mecanismos de control que impidan la reiniciación de la replicación del ADN hasta que se haya completado el ciclo celular y la célula haya pasado por la mitosis. Como se dijo en el Capítulo 5, las células de mamífero emplean miles de orígenes para replicar su ADN, de modo que la iniciación de la replicación de cada uno de estos orígenes debe ser cuidadosamente controlada, para que cada segmento del genoma sólo se replique una vez durante la fase S de cada ciclo celular.

El mecanismo molecular que restringe la replicación del ADN a una vez por ciclo celular implica la acción de una familia de proteínas (denominadas proteínas MCM) que se unen a los orígenes de replicación junto con las proteínas del complejo del origen de replicación (ORC) (ver Fig. 5.16). Las proteínas MCM actúan como «factores licenciadores» que permiten que se inicie la replicación (Fig. 14.11). Su unión al ADN está regulada durante el ciclo celular, de modo que las proteínas MCM sólo son capaces de unirse a los orígenes de replica-

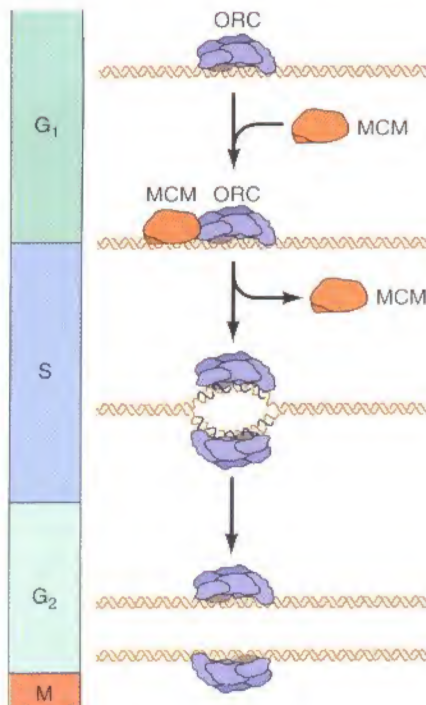



*Figura 14.11*
**Restricción de la replicación del ADN.** La replicación del ADN se restringe a una vez por cada ciclo celular debido a las proteínas MCM, que se unen a los orígenes de replicación junto con las proteínas ORC (complejo del origen de replicación) y que se requieren para la iniciación de la replicación del ADN. Las proteínas MCM sólo son capaces de unirse al ADN en $G_1$, lo que permite que la replicación del ADN comience en la fase S. Una vez que se ha producido la iniciación, las proteínas MCM se desplazan, de tal manera que la replicación no se puede iniciar otra vez hasta después de la mitosis.

ción durante $G_1$, permitiendo que se inicie la replicación del ADN cuando la célula entre en la fase S. Una vez que se ha producido la iniciación, las proteínas MCM son desplazadas del origen, de forma que la replicación no puede iniciarse otra vez hasta que la célula pase por mitosis y entre en la fase $G_1$ del siguiente ciclo celular. Las proteína quinasas que regulan la progresión del ciclo celular (estudiadas en la siguiente sección de este capítulo) impiden que las proteínas MCM se asocien con el ADN durante las fases S, $G_2$ y M del ciclo celular mediante múltiples mecanismos que siguen sin conocerse por completo.

## Reguladores de la progresión del ciclo celular

Uno de los descubrimientos más interesantes de la pasada década ha sido el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que controlan la progresión de las células eucariotas a través del ciclo de división celular. Nuestro conocimiento actual de la regulación del ciclo celular se debe a la convergencia de resultados obtenidos mediante experimentos con organismos tan distintos como las levaduras, erizos de mar, ranas y mamíferos. Estos estudios han revelado que el ciclo celular de todos los eucariotas está controlado por un conjunto de proteína quinasas, conservado en los distintos organismos, que son las responsables de inducir el paso de un estado del ciclo celular a otro.

### *MPF: un dímero de Cdc2 y ciclina*

Tres abordajes experimentales diferentes contribuyeron a identificar las moléculas clave responsables de la regulación del ciclo celular. La primera de estas líneas de investigación tenía como base los estudios con oocitos de rana (Fig. 14.12). Estos oocitos se detienen en la fase $G_2$ del ciclo celular hasta que se estimulan por hormonas, lo que induce su entrada en la fase M de la meiosis (lo que se tratará posteriormente en este Capítulo). En 1971, dos grupos de trabajo independientes (Yoshio Masui y Clement Marker, así como Dennis Smith y Robert Ecker), descubrieron que se podía inducir a los oocitos detenidos en la fase $G_2$ a entrar en la fase M mediante la microinyección del citoplasma de oocitos que hubieran sido estimulados hormonalmente. Por lo tanto, parecía que un factor citoplasmático presente en los oocitos tratados con hormonas era suficiente para inducir la transición de $G_2$ a M en aquellos oocitos que no habían sido expuestos a las hormonas. Debido a que la entrada de los oocitos en meiosis se conoce como maduración de los oocitos, a este factor citoplasmático se le denominó **factor promotor de la maduración (MPF)**. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la actividad del MPF no se restringe a provocar la entrada de los oocitos en meiosis. Por el contrario, el MPF también se encuentra en las células somáticas, donde induce la entrada a la fase M del ciclo mitótico. Por lo tanto, parecía que MPF, en vez de ser específico de los oocitos, era un regulador general del paso de $G_2$ a M.

El segundo abordaje para comprender la regulación del ciclo celular fue el análisis genético de levaduras, del cual fueron pioneros Lee Hartwell y col. a principios de los años 70. Estudiando la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, estos investigadores identificaron mutantes sensibles a la temperatura que eran defectuosos en la progresión del ciclo celular. La característica

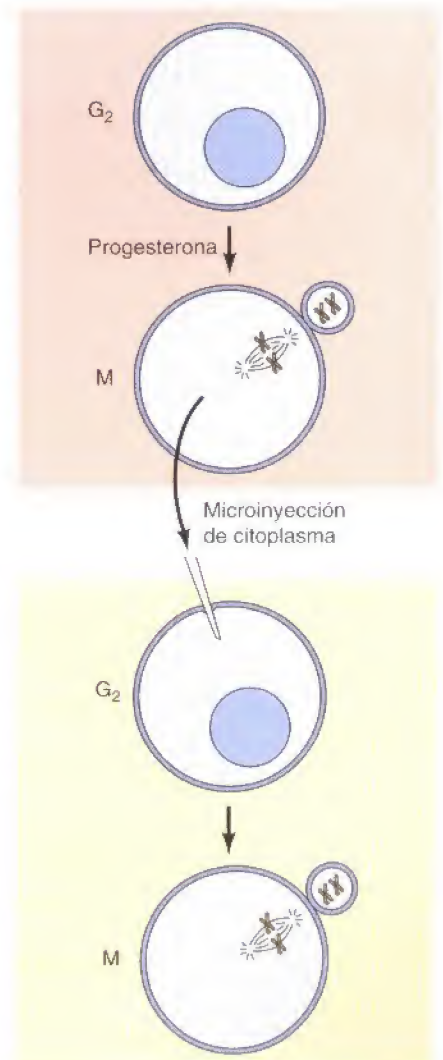
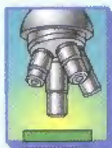


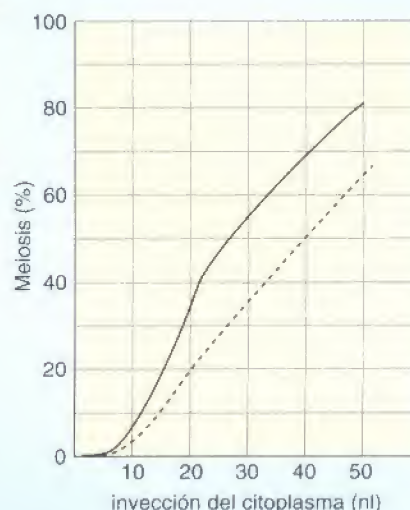

*Figura 14.12*
**Identificación del MPF.** Los oocitos de rana se detienen en la fase $G_2$ del ciclo celular, y la hormona progesterona provoca su entrada en la fase M de la meiosis. En el experimento que aquí se ilustra, a los oocitos detenidos en $G_2$ se les microinyectó citoplasma extraído de oocitos que habían sufrido la transición de $G_2$ a M. Esta transferencia citoplasmática indujo el paso de $G_2$ a M en ausencia del estímulo hormonal, lo que demostraba que era suficiente un factor citoplasmático (MPF) para inducir la entrada en la fase M de la meiosis.



# Experimento clave

## Descubrimiento del MPF

**Control citoplasmático del comportamiento nuclear durante la maduración meiótica de los oocitos de rana**
Yoshio Masui y Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT
*Journal of Experimental Zoology, 1971, Volumen 177, págs. 129-146*




Los oocitos receptores se inyectaron con las cantidades que se indican de citoplasma de oocitos que habían sido tratados con progesterona. El citoplasma donante se obtuvo de la región central del oocito con una micropipeta (línea continua) o a partir de un homogeneizado de oocitos enteros (línea discontinua). Los resultados se presentan como el porcentaje de oocitos inyectados en los que se indujo la reanudación de la meiosis.

### Contexto

Los trasplantes nucleares y los experimentos de fusión nuclear llevados a cabo en los años 60 indicaban que los núcleos transferidos a las células en diferentes estados del ciclo celular mitótico adoptaban el comportamiento de la célula huésped. Por lo tanto, parecía ser que la actividad mitótica del núcleo era regulada por el citoplasma. Sin embargo, el postulado de la existencia de factores citoplasmáticos que controlaban la actividad mitótica del núcleo requería demostrarse mediante un abordaje experimental directo. Esta demostración la proporcionaron los estudios de Masui y Markert, que investigaron el papel de los factores citoplasmáticos en la regulación del comportamiento nuclear durante la meiosis de los oocitos de rana.

Varias características de la meiosis de los oocitos de rana sugerían que esta era controlada por factores citoplasmáticos. Concretamente, la meiosis de los oocitos de rana se detiene al final de la profase de la meiosis I. El tratamiento con la hormona progesterona provoca la reanudación de la meiosis, lo que equivale al paso de $G_2$ a M en las células somáticas. Entonces los oocitos sufren una segunda parada en la metafase de la meiosis II, donde permanecen hasta la fecundación. Masui y Markert propusieron la hipótesis de que tanto los efectos en la meiosis del tratamiento hormonal como los de la fecundación se debían a variaciones en el citoplasma que controlaban de manera indirecta el comportamiento del núcleo. Comprobaron directamente esta hipótesis transfiriendo el citoplasma de los oocitos estimulados con hormonas a los oocitos que no habían sido estimulados. Estos experimentos demostraron que un factor citoplasmático, que Masui y Markert denominaron factor promotor de la maduración (MPF), es el responsable de la inducción de la meiosis tras el tratamiento hormonal.

### Experimentos

Debido a su gran tamaño y a su capacidad de sobrevivir a la inyección mediante micropipetas de cristal, los oocitos de rana constituían un sistema experimental adecuado para comprobar la actividad de los factores citoplasmáticos. El diseño básico de los experimentos de Masui y Markert consistía en quitar el citoplasma de los oocitos donantes que habían sido tratados con progesterona para inducir la reanudación de la meiosis. Cantidades variables de este citoplasma se inyectaron en oocitos receptores que no habían sido tratados. El resultado clave fue que el citoplasma de los oocitos donantes que había sido retirado seis o más horas después del tratamiento hormonal indujo la reanudación de la meiosis en los receptores inyectados (véase Figura). Por el contrario, la inyección del citoplasma de oocitos control que no habían sido expuestos a la progesterona no tuvo efecto sobre los receptores. Por lo tanto, parecía que los oocitos tratados con hormonas contenían un factor citoplasmático que podía inducir la reanudación de la meiosis en aquellos receptores que nunca habían sido expuestos a la progesterona.

Los experimentos de control permitieron desechar la posibilidad de que fuera la propia progesterona el factor inductor de la meiosis en el citoplasma donante. En concreto, se demostró que la inyección de progesterona en oocitos receptores no inducía la meiosis. Sólo la aplicación externa de la hormona es eficaz, lo que indica que la progesterona actúa sobre un receptor celular de la superficie activando a un factor citoplasmático diferente. Experimentos similares realizados independientemente por Dennis Smith y Robert Ecker (La interacción de los esteroides con los oocitos de *Rana pipiens* en la inducción de la maduración. *Dev. Biol.* 25: 232-247, 1971) condujeron a la misma conclusión. Es de destacar que la acción de la progesterona en este sistema difiere de su acción en la mayoría de las células, donde difunde a través de la membrana plasmática y se une a un receptor intracelular (véase Cap. 13). Sin embargo, en los oocitos la progesterona actúa claramente sobre la

## Descubrimiento del MPF (continuación)

superficie celular, activando un factor diferente en el citoplasma del oocito. Puesto que la reanudación de la meiosis del oocito se conoce comúnmente como la maduración del oocito, Masui y Markert acuñaron el término «factor promotor de la maduración» para el regulador de la meiosis recién descubierto.

### Impacto

Tras su descubrimiento en los oocitos de rana, también se encontró el MPF en las células somáticas, donde induce el paso de $G_2$ a M en la mitosis. Por lo tanto, el MPF parecía ser un regulador general de la entrada a la fase M tanto en el ciclo celular meiótico como mitótico. La purificación definitiva del MPF de oocitos de rana en 1988, la genética de levaduras y los estudios en embriones de erizo de mar, convergieron para revelar la identidad de este regulador fundamental del ciclo celular. A saber, el MPF resultó ser un dímero constituido por la ciclina B y la proteína quinasa Cdc2. Estudios posteriores han establecido que tanto la ciclina B como Cdc2 son miembros de familias grandes de proteínas; diferentes ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdc2 funcionan de manera análoga a MPF en la regulación de otros pasos del ciclo celular. Por lo tanto, el descubrimiento de MPF en los oocitos de rana abrió el camino a la comprensión del aparato regulador del ciclo celular que se conserva en todos los eucariotas.



Yoshio Masui



Clement Markert

principal de estos mutantes (denominados *cdc* por mutantes del ciclo de división celular) era que se detenía su crecimiento en determinados puntos del ciclo celular. Por ejemplo, un mutante particularmente importante designado como *cdc28* detenía el ciclo celular en START, lo que indicaba que se necesitaba la proteína Cdc28 para rebasar este punto crítico de regulación en $G_1$ (Fig. 14.13). Paul Nurse y col. aislaron una colección similar de mutantes del ciclo celular en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Entre estos mutantes se encontraba *cdc2*, que detenía el ciclo celular de *S. pombe* tanto en $G_1$ como en

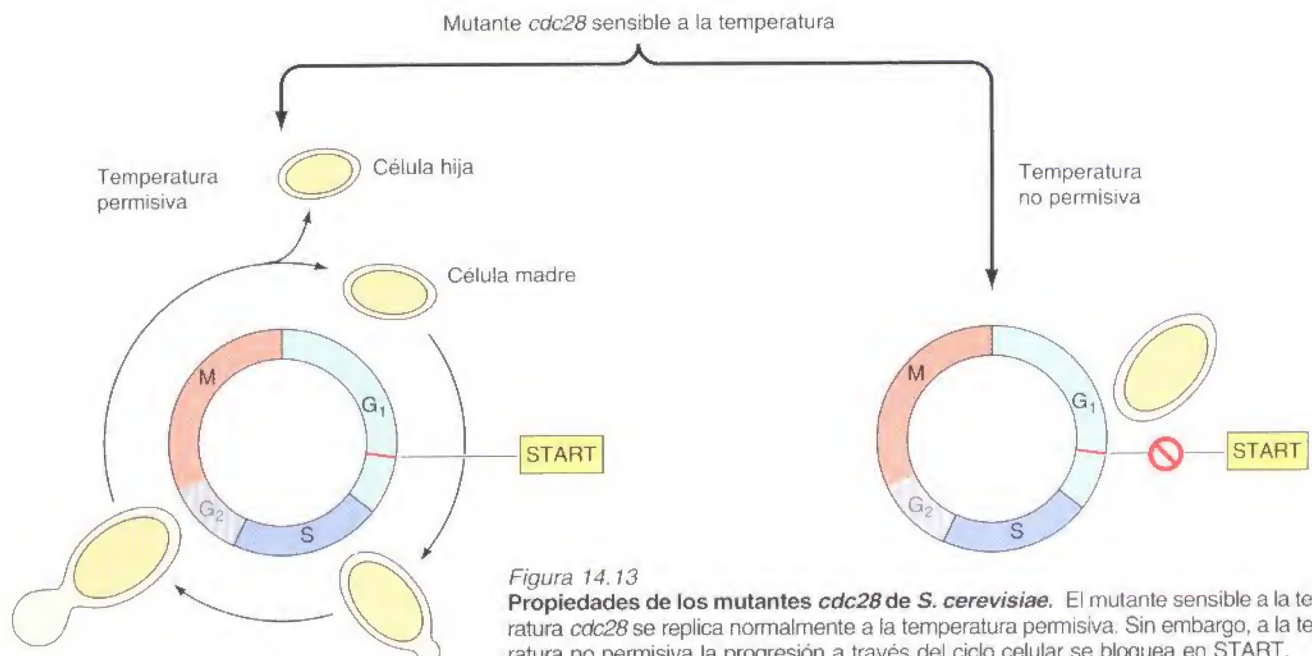



*Figura 14.13*
**Propiedades de los mutantes *cdc28* de *S. cerevisiae*.** El mutante sensible a la temperatura *cdc28* se replica normalmente a la temperatura permisiva. Sin embargo, a la temperatura no permisiva la progresión a través del ciclo celular se bloquea en START.

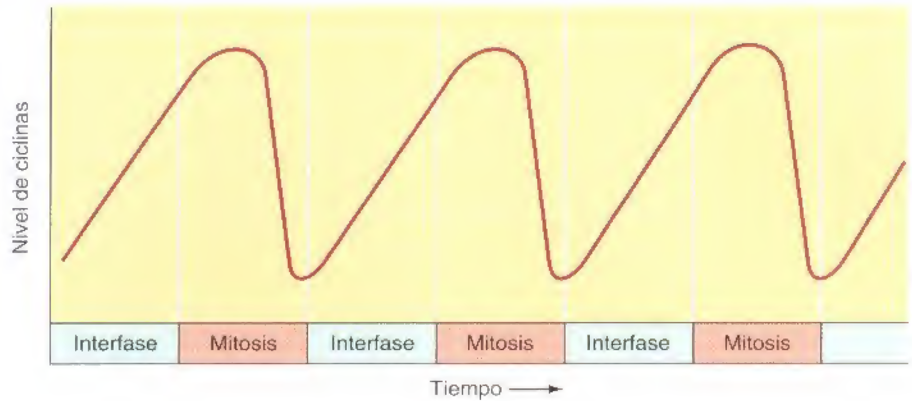



*Figura 14.14*
**Acumulación y degradación de ciclinas en los embriones del erizo de mar.** Las ciclinas fueron identificadas como proteínas que se acumulaban durante la interfase y se degradaban rápidamente hacia el final de la mitosis.

el paso de $G_2$ a M (que es el principal punto de regulación en la levadura de fisión). Estudios posteriores mostraron que *cdc28* de *S. cerevisiae* y *cdc2* de *S. pombe* son genes funcionalmente homólogos, que se requieren para atravesar START así como para entrar en mitosis en ambas especies de levaduras. Para evitar la confusión de la diferente nomenclatura entre *S.cerevisiae* y *S. pombe*, en este texto nos referiremos a la proteína codificada por ambos genes como **Cdc2**. Estudios posteriores de *cdc2* proporcionaron información sobre dos aspectos importantes. Primero, la clonación y la secuenciación de nucleótidos reveló que *cdc2* codifica una proteína quinasa —la primera indicación acerca del papel predominante de la fosforilación de proteínas en la regulación del ciclo celular—. Segundo, se identificó un gen humano relacionado con *cdc2* y se mostró que también era funcional en levaduras, lo que demostraba de manera evidente la actividad conservada de este regulador del ciclo celular.

Por último, la tercera línea de investigación que convergía con la identificación del MPF y con la genética de levaduras, vino de estudios sobre la síntesis de proteínas en embriones tempranos de erizo de mar. Tras la fecundación, estos embriones sufren una serie de divisiones celulares rápidas. Sorprendentemente, los estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas mostraban que la entrada en la fase M en estos ciclos celulares embrionarios requería una nueva síntesis de proteínas. En 1983, Tim Hunt y col. identificaron dos proteínas que mostraban un patrón periódico de acumulación y degradación en embriones de erizo de mar y de almeja. Estas proteínas se acumulaban durante la interfase y eran degradadas rápidamente al final de cada mitosis (Fig. 14.14). Hunt llamó a estas proteínas **ciclinas** (las dos proteínas fueron designadas como ciclina A y ciclina B) y sugirió que podían ser inductores de la mitosis, y que su acumulación y degradación periódica controlaría la entrada y la salida de la fase M. El papel propuesto para las ciclinas se confirmó en 1986 cuando Joan Ruderman y col. mostraron que bastaba con la microinyección de la ciclina A en oocitos de rana para inducir el paso de $G_2$ a M.

Estos abordajes independientes convergieron de manera espectacular en 1988, cuando se purificó el MPF a partir de oocitos de rana en el laboratorio de James Maller. La caracterización molecular del MPF en varios laboratorios mostró que este regulador conservado del ciclo celular está compuesto por dos subunidades fundamentales: Cdc2 y ciclina B (Fig. 14.15). La ciclina B es una subunidad reguladora que se requiere para la actividad catalítica de la proteína quinasa Cdc2, lo que concuerda con el hecho de que la actividad de MPF está controlada por la acumulación y degradación periódica de la ciclina B durante el transcurso del ciclo celular.

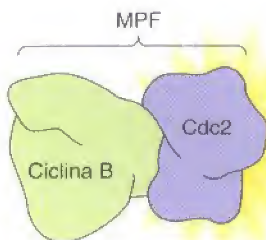



*Figura 14.15*
**Estructura del MPF.** El MPF es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdc2.

Diversos estudios posteriores han confirmado este papel de la ciclina B, así como la regulación del MPF mediante la fosforilación y la desfosforilación de Cdc2 (Fig. 14.16). En las células de mamíferos, la síntesis de la ciclina B comienza en la fase S. La ciclina B entonces se acumula y forma complejos con Cdc2 durante S y $G_2$. Al formarse estos complejos, Cdc2 se fosforila en dos

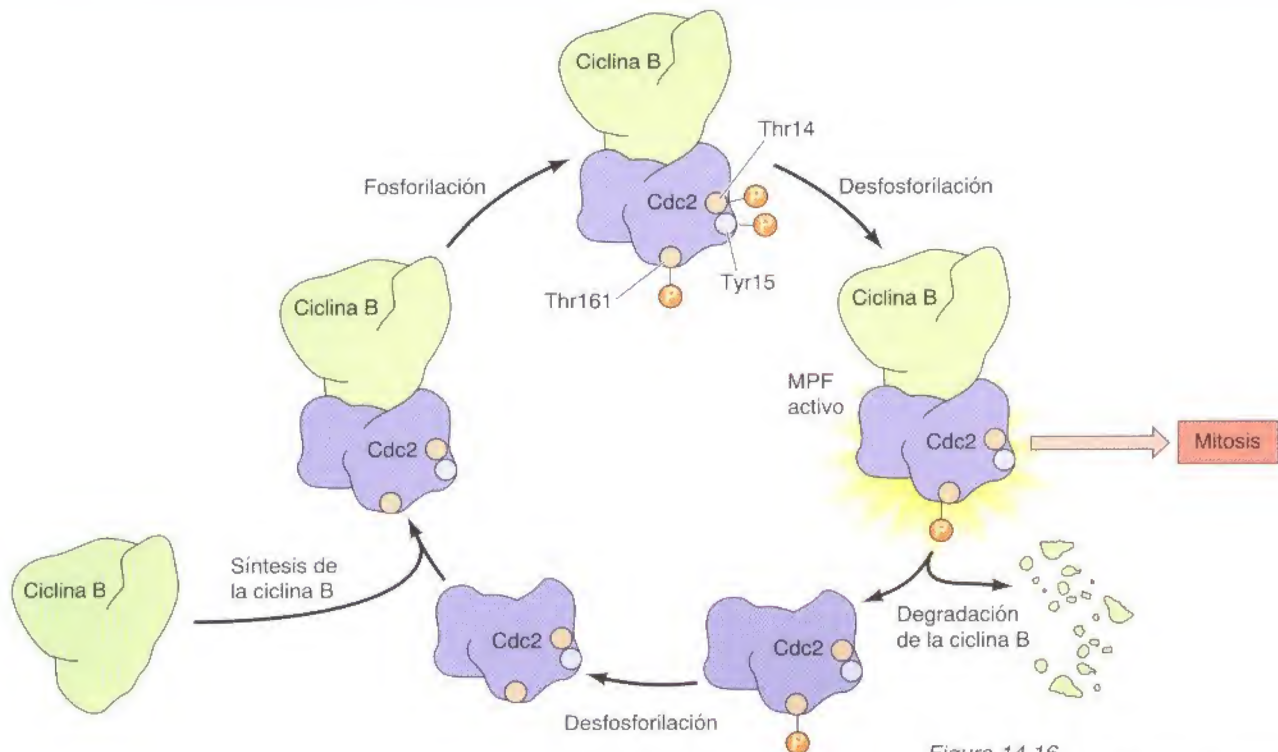



*Figura 14.16*

**Regulación del MPF.** Cdc2 forma complejos con la ciclina B durante S y $G_2$. Entonces Cdc2 es fosforilada en la treonina-161, que se requiere para su actividad, y en la tirosina-15 (y en la treonina-14 en células de vertebrados), lo que inhibe la actividad de Cdc2. La desfosforilación de la Thr-14 y de la Tyr-15 activa a MPF para el paso de $G_2$ a M. La actividad de MPF termina hacia el final de la mitosis por la degradación proteolítica de la ciclina B.

lugares críticos para su regulación. Una de estas fosforilaciones se produce en la treonina-161 y se requiere para la actividad quinasa de Cdc2. La otra es una fosforilación de la tirosina-15 y de la treonina-14 adyacente en vertebrados. La fosforilación de la tirosina-15, catalizada por una proteína quinasa denominada Wee1, inhibe la actividad de Cdc2, y lleva a que se acumulen complejos inactivos Cdc2/ciclina B durante S y $G_2$. Entonces el paso de $G_2$ a M se lleva a cabo por la activación del complejo Cdc2/ciclina B debido a la desfosforilación de la treonina-14 y de la tirosina-15 por una proteína fosfatasa denominada Cdc25.

Una vez activada, la proteína quinasa Cdc2 fosforila varias proteínas diana que inician la fase M, lo que se tratará posteriormente en este Capítulo. Además, la actividad de Cdc2 provoca la degradación de la ciclina B, que se produce por una proteolisis mediada por ubiquitina. Esta destrucción proteolítica de la ciclina B inactiva a Cdc2, lo que lleva a la célula a salir de la mitosis, a sufrir la citocinesis, y a volver a la interfase.

## *Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas*

La estructura y función de MPF (Cdc2/ciclina B) no sólo proporciona una base molecular para comprender la entrada y salida de la fase M, sino también las bases para dilucidar la regulación de otros pasos del ciclo celular. La información que proporcionó la caracterización del complejo Cdc2/ciclina B ha tenido un profundo impacto en la comprensión de la regulación del ciclo celular. En concreto, investigaciones posteriores han establecido que tanto Cdc2 como la ciclina B son miembros de grandes familias de proteínas relacionadas, en las que los diferentes miembros de estas familias controlan la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular.

Como ya se trató anteriormente, Cdc2 controla el paso a través de START así como la entrada en mitosis en las levaduras. Sin embargo, esto lo hace en asociación con diferentes ciclinas (Fig. 14.17). Concretamente, la transición de $G_2$ a M la lleva a cabo Cdc2 junto con las ciclinas mitóticas de tipo B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). Sin embargo, el paso a través de START lo controla Cdc2 en aso-

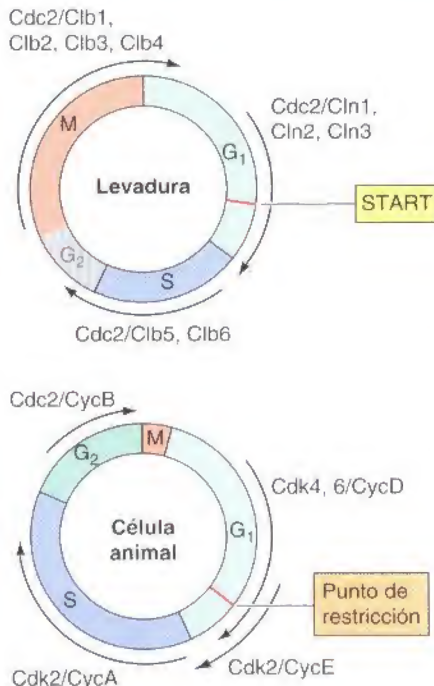



*Figura 14.17*
**Complejos de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas.** En las levaduras, el paso a través de START lo controla Cdc2 asociado a las ciclinas $G_1$ (Cln1, Cln2, Cln3). Los complejos de Cdc2 con diferentes ciclinas tipo B (Clb's) regulan la progresión a través de la fase S y la entrada en la mitosis. En las células animales, el paso a través del punto de restricción de $G_1$ es controlado por complejos de Cdk4 y Cdk6 con ciclinas del tipo D. Los complejos Cdk2/ciclina E intervienen más adelante en $G_1$ y se requieren para el paso de $G_1$ a S. Los complejos Cdk2/ciclina A se requieren para la progresión a través de la fase S, y los complejos Cdc2/ciclina B son responsables del paso de $G_2$ a M.

ciación con una clase diferente de ciclinas denominadas **ciclinas $G_1$** o **Cln**'s. Entonces Cdc2 se asocia con un tipo diferente de ciclinas B (Clb5 y Clb6), que se requieren para la progresión a través de la fase S. Estas asociaciones de Cdc2 con diferentes ciclinas del tipo B y $G_1$ provocan la fosforilación por Cdc2 de diferentes proteínas sustrato, lo que se requiere para la progresión a través de las fases específicas del ciclo celular.

Los ciclos celulares de los eucariotas superiores se controlan, no solamente por múltiples ciclinas, sino también por múltiples proteína quinasas relacionadas con Cdc2. Estas quinasas se conocen como **Cdk**'s (de quinasas dependientes de ciclina). Puesto que Cdc2 es el miembro original de esta familia, también se le conoce como Cdk1.

Todos estos miembros de la familia Cdk se asocian con ciclinas específicas para llevar a cabo la progresión a través de los diferentes estados del ciclo celular (véase Fig. 14.17). Por ejemplo, el paso de $G_1$ a S se regula principalmente por Cdk2 y Cdk4 (y en algunas células Cdk6) en asociación con las ciclinas D y E. Los complejos de Cdk4 y Cdk6 con las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3) desempeñan un papel crítico en la progresión a través del punto de restricción en $G_1$. La ciclina E se expresa posteriormente en $G_1$, y los complejos Cdk2/ciclina E se requieren para el paso de $G_1$ a S y el inicio de la síntesis del ADN. Los complejos de Cdk2 con la ciclina A intervienen en la progresión de las células a través de la fase S. Como ya se ha tratado, los complejos de Cdc2 con la ciclina B dirigen el paso de $G_2$ a M.

La actividad de las Cdk's durante la progresión del ciclo celular se regula por, al menos, cuatro mecanismos moleculares (Fig. 14.18). Como ya se ha tratado en el caso de Cdc2, el primer nivel de regulación implica la asociación de las Cdk's con las ciclinas correspondientes. Así, la formación de los complejos específicos Cdk/ciclina está controlada por la síntesis y degradación de las ciclinas. En segundo lugar, la activación de los complejos Cdk/ciclina requiere la fosforilación de un residuo de treonina de la Cdk conservado alrededor de la posición 160. Esta fosforilación que activa la Cdk está catalizada por una enzima denominada CAK (de quinasa activadora de Cdk), que a su vez está constituida por una Cdk (Cdk7) unida con la ciclina H. Los complejos de Cdk7 y ciclina H se asocian con el factor de transcripción TFIIH, que se requiere para la iniciación de la transcripción mediante la ARN polimerasa II (véase Cap. 5). Por lo tanto, parece ser que este miembro de la familia de las Cdk's participa en la transcripción así como en la regulación del ciclo celular.

A diferencia de la fosforilación activadora producida por CAK, el tercer mecanismo de la regulación de Cdk implica la fosforilación inhibidora de residuos de tirosina cerca del extremo amino terminal de Cdk, que está catalizada por la proteína quinasa Wee1. En concreto, tanto Cdc2 como Cdk2 se inhiben por la

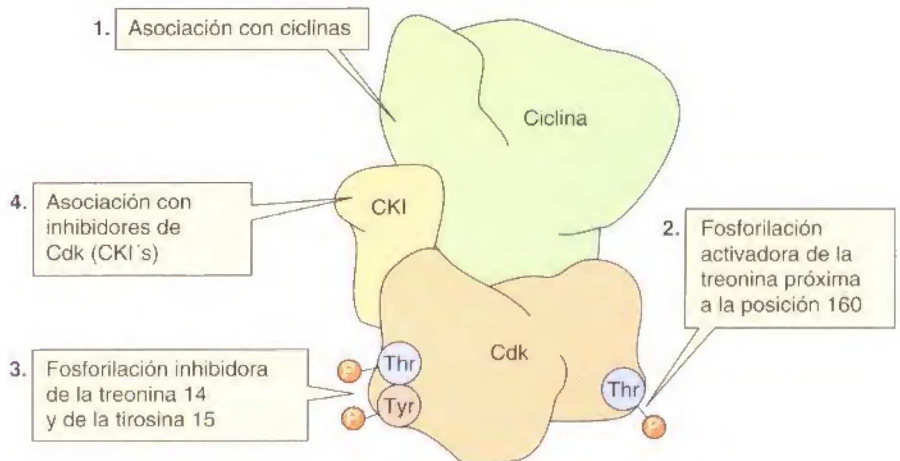



*Figura 14.18*
**Mecanismos de regulación de Cdk.** Las actividades de las Cdk's se regulan por cuatro mecanismos moleculares.

**TABLA 14.1.** Inhibidores de Cdk

| Inhibidor | Complejo Cdk/ciclina | Fase afectada del ciclo celular |
|---|---|---|
| **Células animales** | | |
| Familia Cip/Kip (p21, p27, p57) | Cdk4/ciclina D | $G_1$ |
| | Cdk6/ciclina D | $G_1$ |
| | Cdk2/ciclina E | $G_1$/S |
| | Cdk2/ciclina A | S |
| Familia Ink4 (p15, p16, p18, p19) | Cdk4/ciclina D | $G_1$ |
| | Cdk6/ciclina D | $G_1$ |

fosforilación de la tirosina-15, y en el caso de los vertebrados, de la treonina-14 adyacente. Estas Cdk's se activan por la desfosforilación de estos residuos por miembros de la familia Cdc25 de proteína fosfatasas.

Además de la regulación por fosforilación de las Cdk's, su actividad también puede regularse por la unión de proteínas inhibidoras (denominadas **inhibidores de Cdk** o **CKIs**) a los complejos Cdk/ciclina. En las células de mamíferos, dos familias de inhibidores de Cdk son las responsables de regular los diferentes complejos Cdk/ciclina (Tabla 14.1). Los miembros de la familia Cip/Kip regulan todas las etapas de la progresión a través de las fase $G_1$ y S, inhibiendo los complejos que forman Cdk2, 4 y 6 con las ciclinas A, D y E. Por el contrario, los miembros de la familia Ink4 son específicos para los complejos que forman Cdk4 y 6 con la ciclina D, por lo que las CKIs Ink4 sólo regulan la progresión a través del punto de restricción en $G_1$. En las levaduras, las diferentes CKIs regulan de igual manera diferentes etapas de la progresión del ciclo celular, inhibiendo complejos Cdk/ciclina específicos. Por lo tanto, el control de los inhibidores de Cdk proporciona un mecanismo adicional para regular la actividad de Cdk. Los efectos combinados de todos estos tipos de regulación de Cdk son los responsables del control de la progresión del ciclo celular en respuesta tanto a los puntos de control como a la variedad de los estímulos extracelulares que regulan la proliferación celular.

### *Factores de crecimiento y ciclinas de tipo D*

Como ya se trató anteriormente, la proliferación de las células animales se regula principalmente mediante diversos factores de crecimiento extracelulares que controlan la progresión de las células a través del punto de restricción en las postrimerías de $G_1$. En ausencia de los factores de crecimiento las células son incapaces de rebasar el punto de restricción y se inactivan, con lo que suelen entrar en el estado de reposo denominado $G_0$; desde éste pueden volver a entrar en el ciclo celular al ser estimuladas por los factores de crecimiento. Este control de la progresión del ciclo celular mediante los factores de crecimiento extracelulares implica que las vías de la señalización intracelular que se activan posteriormente (*downstream*) a los receptores de los factores de crecimiento (que se trataron en el Capítulo anterior) intervienen, en última instancia, regulando los componentes de la maquinaria del ciclo celular.

Un vínculo importante entre la señalización por los factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular son las ciclinas del tipo D (Fig. 14.19). La síntesis de la ciclina D se induce en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, como resultado de la señalización a través de la vía Ras/Raf/ERK, de tal manera que se sintetizan ciclinas mientras los factores de crecimiento están presentes. Sin embargo, las ciclinas de tipo D también se degradan rápidamente, por lo que su concentración intracelular desciende bruscamente en ausencia de los factores de crecimiento. Así, mientras los factores de crecimiento estén presentes durante $G_1$, los complejos de Cdk4/ciclina D hacen que las células atraviesen el punto de restricción. Por otro lado, si se eliminan los factores de crecimiento antes de este punto, los niveles de ciclina D descienden rápidamen-

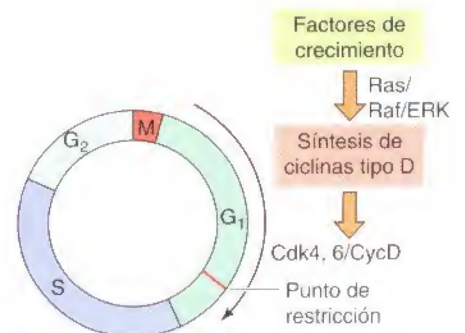



*Figura 14.19*
**Inducción de las ciclinas tipo D.** Los factores de crecimiento regulan la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción de $G_1$ induciendo la síntesis de ciclinas tipo D mediante la vía de señalización Ras/Raf/ERK.

te, y las células no pasan a través de $G_1$ a S; por el contrario, se inactivan y entran en $G_0$. Por lo tanto, la inducción y el rápido recambio de las ciclinas tipo D vinculan la señalización por factores de crecimiento con la maquinaria del ciclo celular, lo que permite a los factores de crecimiento extracelulares controlar la progresión de las células a través de $G_1$.

Puesto que la ciclina D es una diana importante de la señalización por factores de crecimiento, se podría esperar que las alteraciones en la regulación de la ciclina D alteraran la regulación del crecimiento celular, característica de las células cancerosas. Así, se ha encontrado que la causa de muchos cánceres humanos es una regulación defectuosa del ciclo celular, al igual que la causa de muchos otros son alteraciones en las vías de señalización intracelular activadas por los receptores de los factores de crecimiento (véase el Cap. 13). Por ejemplo, las mutaciones que dan lugar a una expresión continua de la ciclina D1 contribuyen al desarrollo de varios tipos de cánceres humanos, entre los que se incluyen los linfomas y el cáncer de pulmón. Igualmente, las mutaciones que inactivan a los inhibidores Ink4 de Cdk (p. ej., p16) que se unen a los complejos Cdk4,6/ciclina D, se encuentran con frecuencia en las células humanas cancerosas.

La relación entre la ciclina D, el control del crecimiento celular, y el cáncer se ve reforzada por el hecho de que una proteína sustrato de los complejos Cdk4,6/ciclina D aparece mutada en varios tumores humanos. Esta proteína, denominada **Rb**, se identificó como el producto de un gen responsable del retinoblastoma, un tipo de tumor de ojo infantil hereditario poco frecuente (véase el Cap. 15). Estudios posteriores mostraron que las mutaciones que ocasionan la ausencia de la proteína Rb funcional, no sólo se encuentran en el retinoblastoma sino en diversos cánceres humanos más comunes. Rb es el prototipo de un **gen supresor de tumores** —un gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor—. Mientras que las proteínas oncogénicas como Ras (véase el Cap. 13) y la ciclina D provocan la proliferación celular, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores funcionan como frenos que ralentizan la progresión del ciclo celular. Otros ejemplos de reguladores del ciclo celular codificados por genes supresores de tumores son los inhibidores Ink4 de Cdk que se unen a los complejos Cdk4,6/ciclina D, y el importante regulador del crecimiento celular p53, del que ya se habló en este Capítulo.

Estudios posteriores acerca de Rb, revelaron que desempeña un papel fundamental en acoplar la maquinaria del ciclo celular con la expresión de aquellos genes que se requieren para la progresión del ciclo celular y para la síntesis del ADN (Fig. 14.20). La actividad de Rb se regula mediante cambios en su fosforilación a medida que las células avanzan por el ciclo. Concretamente, Rb es fosforilada por los complejos Cdk4,6/ciclina D a medida que las células rebasan el punto de restricción en $G_1$. En su estado poco fosforilado (en $G_0$ o en $G_1$ temprana), Rb se une a los miembros de la familia de los factores de transcripción **E2F**, que regulan la expresión de varios genes relacionados con la progresión del ciclo celular, incluyendo al gen que codifica para la ciclina E. E2F se une a sus secuencias diana tanto en presencia como en ausencia de Rb. Pero Rb actúa como un represor, de tal manera que el complejo Rb/E2F impide que se transcriban los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4,6/ciclina D provoca que el Rb fosforilado se disocie de E2F, lo que activa la transcripción de sus genes diana. Por lo tanto, Rb interviene como un interruptor molecular que convierte a E2F de un represor a un activador de los genes requeridos para la progresión del ciclo celular. Por su parte, el control de Rb a través de la fosforilación por Cdk4,6/ciclina D acopla esta regulación de la expresión génica a la disponibilidad de factores de crecimiento en $G_1$

### *Inhibidores de la progresión del ciclo celular*

La proliferación celular se regula no sólo por factores de crecimiento sino también por diversas señales que inhiben la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, los agentes que dañan el ADN provocan que el ciclo celular se detenga,

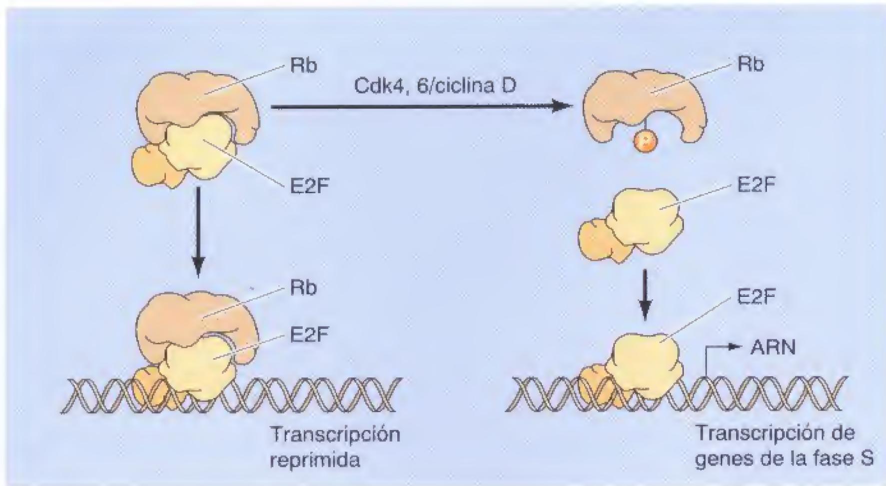



*Figura 14.20*
**Regulación del ciclo celular por Rb y E2F.** En su estado poco fosforilado, Rb se une a miembros de la familia E2F reprimiendo la transcripción de los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por los complejos Cdk4,6/ciclina D provoca su disociación de E2F en la fase $G_1$ avanzada. Entonces E2F activa la expresión de sus genes diana, que codifican proteínas necesarias para la continuación del ciclo celular.

dando tiempo de esta manera a la célula a reparar el daño. Además, los contactos celulares y varios factores extracelulares intervienen inhibiendo la proliferación de sus células diana en vez de estimulándola. Los efectos de estas señales inhibidoras también son mediados por los reguladores de la maquinaria del ciclo celular, con frecuencia a través de la activación de los inhibidores de Cdk.

Un claro ejemplo de la acción de los inhibidores de Cdk lo proporciona la detención del ciclo celular en respuesta a las lesiones en el ADN, que tiene lugar mediante la intervención de la proteína p53 (tratada anteriormente en este Capítulo). La proteína p53 es un regulador de la transcripción que interviene, al menos en parte, activando la expresión del inhibidor de Cdk, p21 (Fig. 14.21). La proteína p21 inhibe varios complejos Cdk/ciclina, y su inducción por p53 parece que representa al menos uno de los mecanismos dependientes de p53 de que el ciclo celular se detenga tras la lesión del ADN. Además de inhibir la progresión del ciclo celular mediante su interacción con Cdk's, p21 puede inhibir directamente la replicación del ADN. Concretamente, p21 se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que como ya se trató en el Capítulo 5, es una subunidad de la ADN polimerasa $\delta$. De esta manera, p21 desempeña un doble papel en la detención del ciclo celular inducida por daños en el ADN: no solamente bloquea la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de Cdk's, sino que también inhibe directamente la replicación del ADN en fase S.

El inhibidor extracelular de la proliferación de las células animales mejor caracterizado es el TGF-$\beta$ —un factor polipeptídico que inhibe la proliferación de varios tipos de células epiteliales deteniendo la progresión del ciclo celular en $G_1$. Esta acción de TGF-$\beta$ parece que se produce por la activación del inhibidor p15 de Cdk, que se une a los complejos Cdk4,6/ciclina D. Como resultado, si Cdk4 no está activo, se bloquea la fosforilación de Rb y el ciclo celular se detiene en $G_1$.

Para regular la progresión del ciclo celular a través de los puntos de control de S y $G_2$, se utiliza un mecanismo molecular diferente, que impide la progresión del ciclo celular en respuesta a ADN sin replicar o dañado. Como se estudió anteriormente en este capítulo, la detención del ciclo celular en estos puntos de control está mediada por las proteína quinasas Chk1 y Chk2 (ver Fig. 14.9). Chk1 y Chk2 fosforilan e inhiben a la proteína fosfatasa Cdc25C, que es responsable de defosforilar y activar a los complejos Cdc2/ciclina B (Fig. 14.22). En ausencia de la activación de Cdc2, la progresión de la mitosis está bloqueada y la célula permanece detenida en $G_2$. Del mismo modo, Chk1 y Chk2 fosforilan un miembro relacionado de la familia Cdc25, Cdc25A. Cdc25A defosforila y activa a los complejos de Cdk2 y ciclinas A o E, que son responsables de la iniciación y la progresión de la fase S. La fosforilación desencadena la rápida degra-

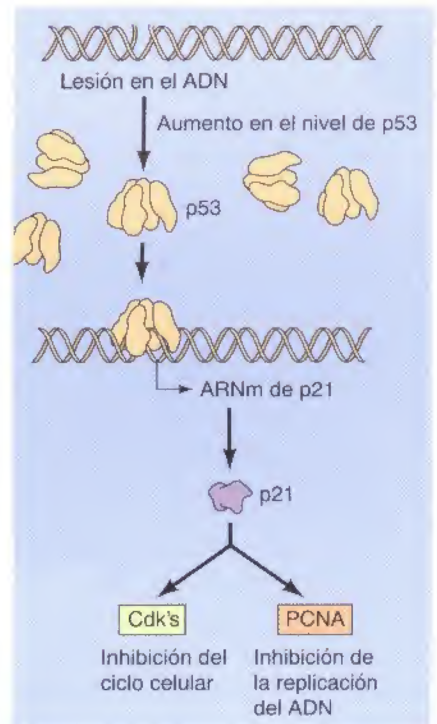
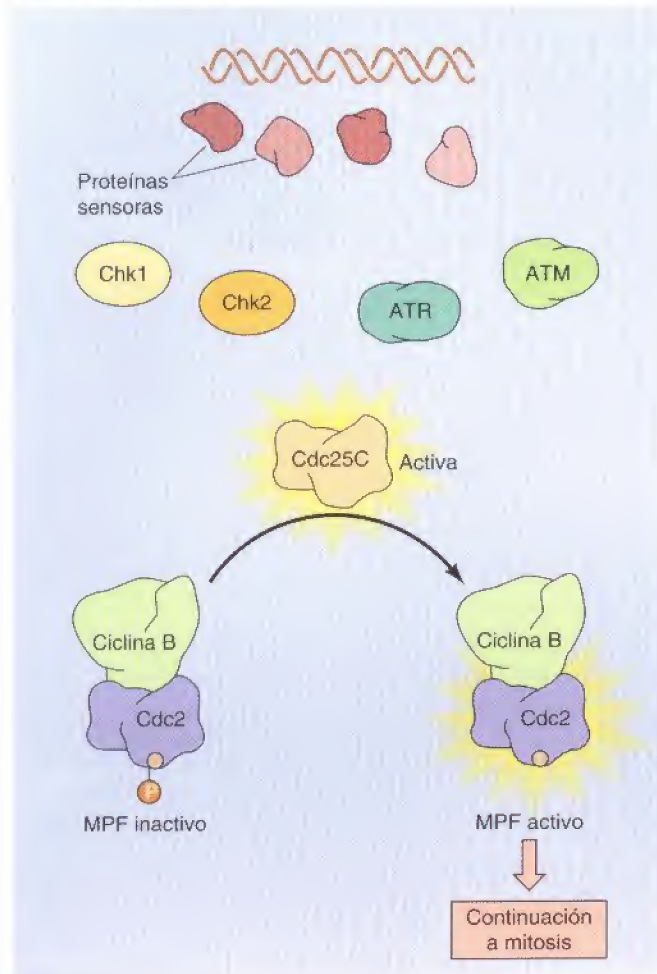



*Figura 14.21*
**Inducción de p21 debido a lesiones en el ADN.** Las lesiones en el ADN provocan el aumento del nivel intracelular de p53, lo que activa la transcripción del gen que codifica el inhibidor de Cdk, p21. Además de inhibir la progresión del ciclo celular mediante su unión a los complejos Cdk/ciclina, p21 puede inhibir directamente la síntesis del ADN al interaccionar con PCNA (una subunidad de la ADN polimerasa $\delta$).



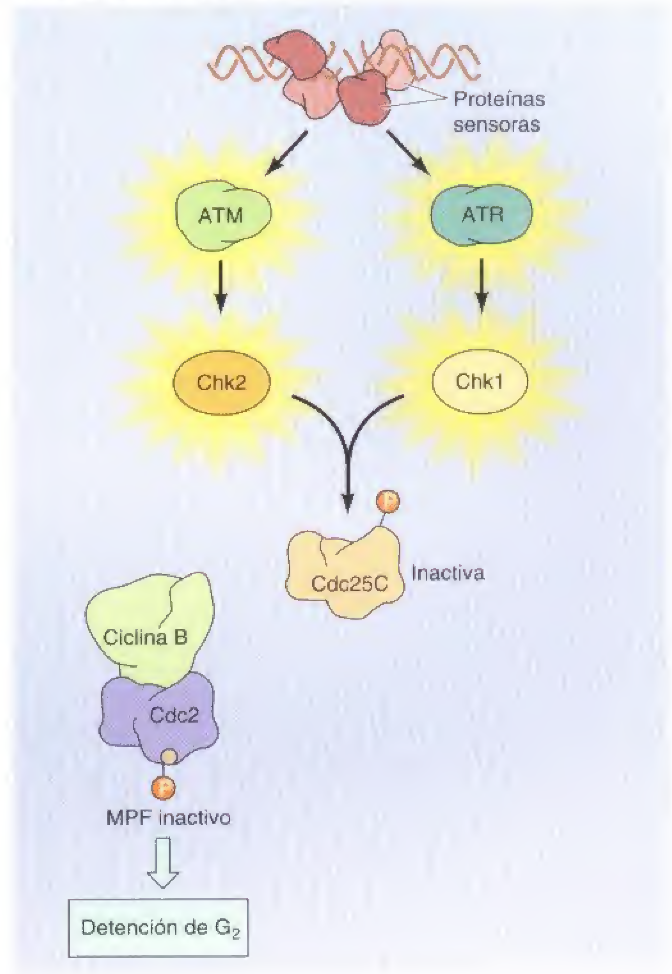




*Figura 14.22*
**Regulación del punto de control de $G_2$.** Un complejo de proteínas del punto de control reconoce el ADN dañado o que no se ha replicado y activa a la proteína quinasa Chk1, la cual fosforila e inhibe a la proteína fosfatasa Cdc25. La inhibición de Cdc25 impide que Cdc2 se desfosforile y se active.

dación de Cdc25A, resultando en la detención del ciclo celular en respuesta al ADN dañado.

## Sucesos de la fase M

La fase M es el período más llamativo del ciclo celular, en el que se produce la reorganización de casi todos los componentes de la célula. Durante la mitosis (división nuclear) los cromosomas se condensan, la envuelta nuclear de la mayoría de las células se desintegra, el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso mitótico, y los cromosomas migran a polos opuestos. Tras la segregación de los cromosomas se suele producir la división de la célula (citocinesis). Aunque muchos de estos sucesos ya se han tratado en Capítulos anteriores al hablar de la estructura y función del núcleo y del citoesqueleto, se revisan aquí en el contexto de la fase M y de la acción del MPF.

### *Etapas de la mitosis*

Aunque muchos de los detalles de la mitosis varían entre los diferentes organismos, los procesos básicos que aseguran la segregación fidedigna de las cromátidas hermanas se conservan en todos los eucariotas. Entre estos procesos básicos de la mitosis se incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, y la unión de los cromosomas a los microtúbulos del

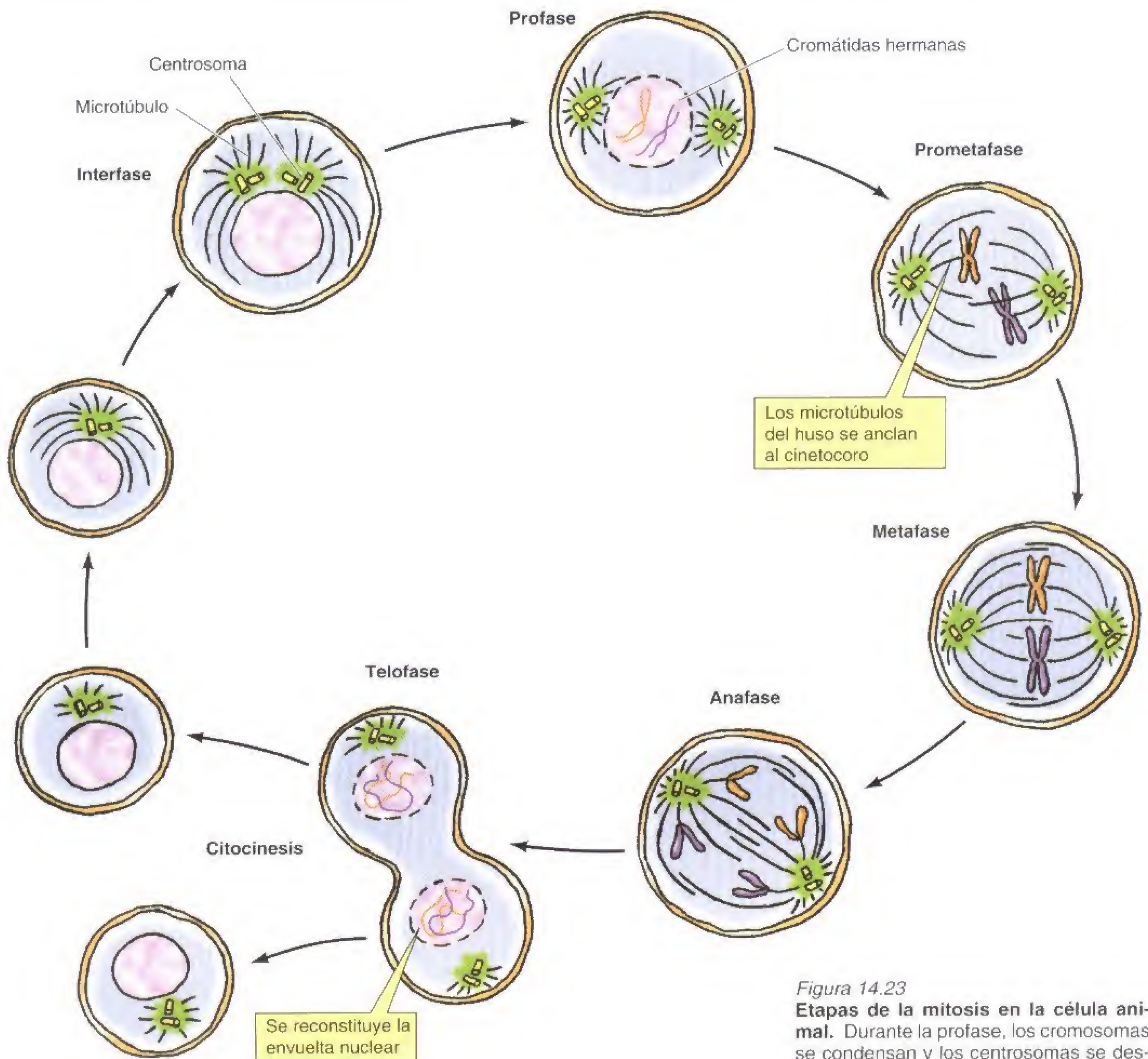



*Figura 14.23*

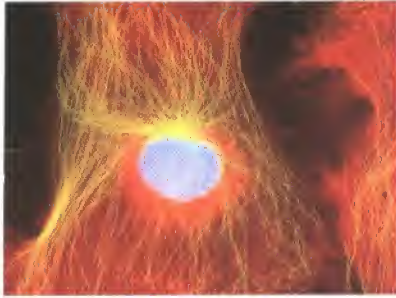
**Etapas de la mitosis en la célula animal.** Durante la profase, los cromosomas se condensan y los centrosomas se desplazan a lados opuestos del núcleo, comenzando la formación del huso mitótico. La ruptura de la envuelta nuclear permite a los microtúbulos del huso anclarse a los cinetocoros de los cromosomas. Durante la prometafase los cromosomas se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y el centro de la célula, para finalmente quedar alineados en la zona media del huso (metafase). En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis termina con la reconstitución de las envolturas nucleares y con la descondensación de los cromosomas en la telofase, y la citocinesis da lugar a dos células hijas interfásicas. Conviene destacar que cada célula hija recibe un centrosoma que se duplicará previamente a la siguiente mitosis.

huso. Una vez llegado este punto, las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso, tras lo que se forman los núcleos hijos.

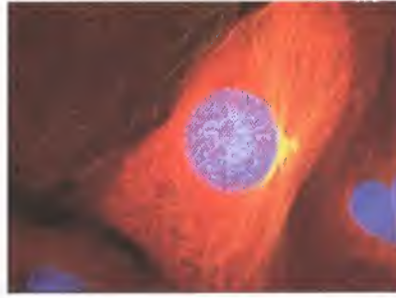
Tradicionalmente, la mitosis se divide en cuatro etapas —**profase**, **metafase**, **anafase**, y **telofase**— que, en el caso de la célula animal, se ilustran en las Figuras 14.23 y 14.24. El comienzo de la profase queda determinado por la aparición de los cromosomas condensados, cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas (las moléculas de ADN hijas que se produjeron en la fase S). Estas moléculas de ADN replicado permanecen entrelazadas durante la fase S y $G_2$, desenmarañándose durante el proceso de la condensación de la cromatina. Las cromátidas hermanas condensadas se mantienen unidas a través del **centrómero**, que (como ya se trató en el Cap. 4) es una secuencia de ADN a la que se unen proteínas dando lugar al **cinetocoro** —el lugar de anclaje de los microtúbulos del huso—. Además de la condensación de los cromosomas, durante la profase se producen cambios en el citoplas-

**Mitosis**

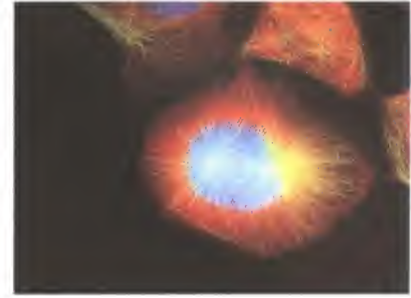
Interfase



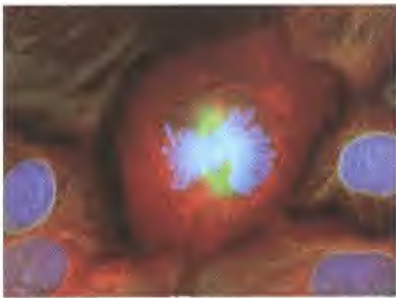
Profase temprana



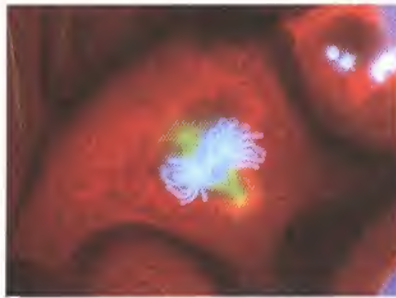
Profase tardía



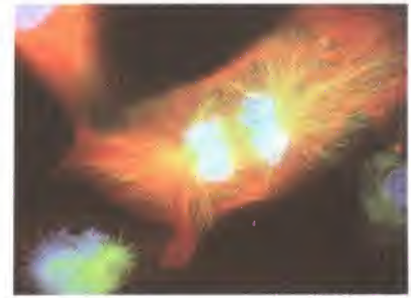
Prometafase



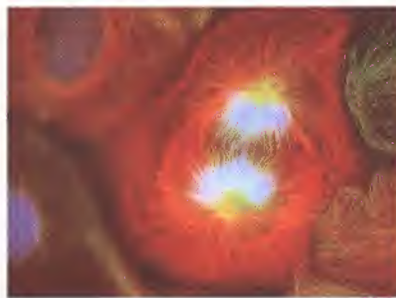
Metafase



Anafase temprana



Anafase tardía



Telofase

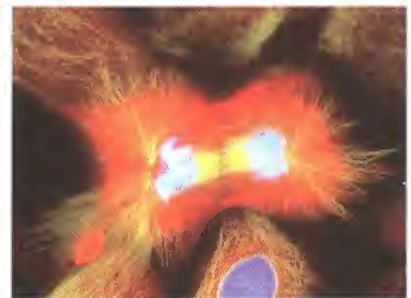


*Figura 14.24*
**Micrografías de fluorescencia de la cromatina, la queratina y los microtúbulos durante la mitosis de células del pulmón de tritón.** La cromatina se tiñe de azul, la queratina se tiñe de rojo, y los microtúbulos se tiñen de verde. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

ma que conducen al desarrollo del huso mitótico. Los **centrosomas** (que se duplicaron en la interfase) se separan y migran a lados opuestos del núcleo. Ahí actúan como los dos polos del **huso mitótico**, que comienza a formarse durante la profase tardía.

En los eucariotas superiores el final de la profase se corresponde con la rotura de la envuelta nuclear. Sin embargo, como ya se trató en el Capítulo 8, la rotura de la envuelta nuclear no es una característica general de la mitosis. En concreto, las levaduras y muchos otros eucariotas unicelulares sufren una «mitosis cerrada», en la que la envuelta nuclear permanece intacta (véase la Fig. 8.30). En estas células, los cuerpos polares del huso están incluidos en la envuelta nuclear, y el núcleo se divide en dos tras la migración de los cromosomas hijos a los polos opuestos del huso.

Una vez terminada la profase, la célula entra en **prometafase** —un período de transición entre la profase y la metafase—. Durante la prometafase los microtúbulos del huso mitótico se anclan a los cinetocoros de los cromosomas condensados. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se disponen a los dos lados opuestos del cromosoma, por lo que se unen a los microtúbulos que surgen de los polos opuestos del huso. Los cromosomas se mueven hacia delante y hacia atrás hasta que se alinean en la placa metafásica en la mitad del huso. Llegado a este punto la célula ha alcanzado la metafase.

La mayoría de las células permanecen en metafase poco tiempo antes de continuar a la anafase. La transición de metafase a anafase se produce por la rotura de la unión entre las cromátidas hermanas, las cuales se separan y migran a polos opuestos del huso. La mitosis finaliza con la telofase, durante la cual los núcleos se regeneran y los cromosomas se descondensan. La citocinesis normalmente comienza durante la anafase tardía y se completa al final de la telofase, dando lugar a dos células hijas en interfase.

## *MPF y progresión a la metafase*

La mitosis supone unos cambios muy importantes en varios componentes celulares, que llevan a la reorganización casi total de la estructura celular. Como ya se trató anteriormente en este Capítulo, estos procesos se inician mediante la activación de la proteína quinasa MPF (Cdc2/ciclina B).

Parece ser que MPF no sólo actúa como un regulador principal del paso a la fase M, fosforilando y activando otras proteína quinasas posteriores, sino que también interviene directamente fosforilando algunas proteínas estructurales involucradas en esta reorganización celular (Fig. 14.25).

La condensación de la cromatina interfásica para dar lugar a los cromosomas compactos de las células mitóticas es un suceso clave en la mitosis, ya que permite que los cromosomas se desplacen por el huso mitótico sin romperse y sin enredarse entre ellos. Como ya se trató en el Capítulo 4, la cromatina en los núcleos interfásicos se condensa aproximadamente por un factor de mil para formar los cromosomas metafásicos. Esta cromatina tan condensada no puede transcribirse, por lo que la transcripción cesa al producirse la condensación de la cromatina. A pesar de la gran importancia de este hecho, todavía no se comprende por completo ni la estructura de los cromosomas metafásicos ni los mecanismos moleculares de la condensación de la cromatina. Sin embargo, recientemente se han descrito unos complejos proteicos denominados condensinas, que se considera que llevan a cabo la condensación de los cromosomas enrollando el ADN sobre sí mismo, lo que da lugar a la estructura condensada de los cromosomas mitóticos. Las condensinas son fosforiladas directamente por la proteína quinasa Cdc2, lo que las activa al entrar las células en mitosis,

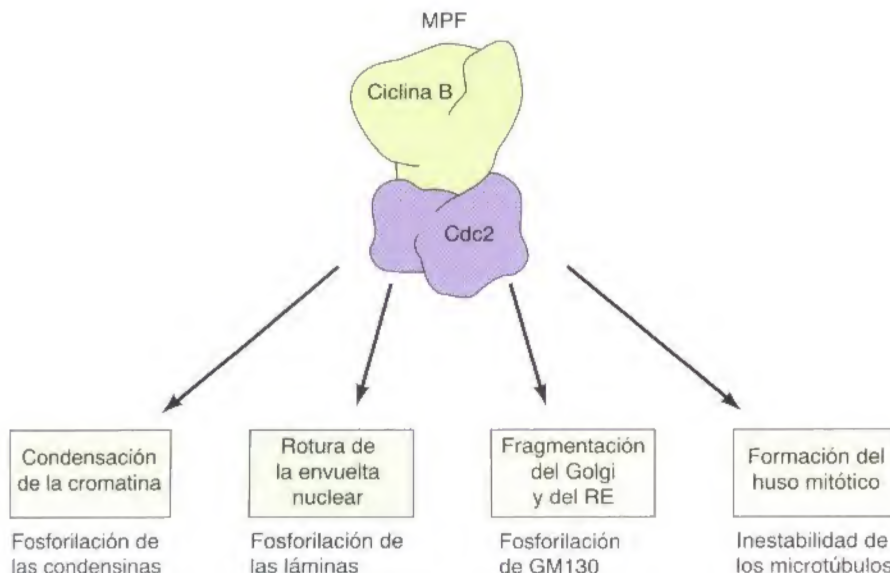



*Figura 14.25*
**Dianas del MPF.** El MPF induce varios cambios en el núcleo y en el citoplasma durante la puesta en marcha de la fase M; esto lo realiza activando otras proteína quinasas y fosforilando proteínas como las condensinas y las láminas nucleares.

resultando la condensación de la cromatina. Una alteración molecular que suele acompañar a la condensación de los cromosomas es la fosforilación de la histona H1, por lo que hay que señalar que la histona H1 también es un sustrato de Cdc2. Sin embargo, la fosforilación de la histona H1 no es un requisito necesario para que los cromosomas se condensen, por lo que el significado de esta fosforilación no está claro. Por otro lado, se ha demostrado que para que los cromosomas se condensen se requiere la fosforilación de la histona H3. Pero, de manera sorprendente, la histona H3 no es fosforilada por Cdc2, sino por otra proteína quinasa (aurora B) que también es activada durante la mitosis.

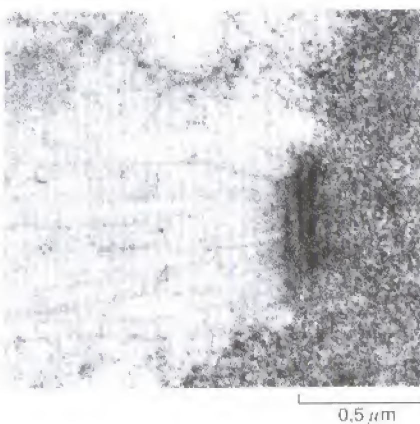
La rotura de la envuelta nuclear, que es uno de los sucesos más llamativos de la mitosis, constituye la diana mejor caracterizada para la acción del MPF. Como ya se trató en el Capítulo 8, Cdc2 fosforila a las láminas, lo que provoca la despolimerización de la lámina nuclear (véase Fig. 8.31). Tras esto, la membrana nuclear se fragmenta en pequeñas vesículas que terminan fundiéndose para dar lugar a nuevos núcleos hijos en la telofase. De igual manera, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se fragmentan en vesículas pequeñas, que se distribuirán a las células hijas en la citocinesis. El MPF también induce la rotura de estas membranas, y puede que sea mediada por la fosforilación de la proteína GM130 de la matriz del Golgi por parte de Cdc2; esta proteína se requiere para la unión a la membrana del Golgi de las vesículas revestidas COPI. La fosforilación y la inactivación de GM130 por Cdc2 inhibe la unión y la fusión de las vesículas, lo que conduce a que el aparato de Golgi se fragmente. Sin embargo, en este proceso también pueden verse involucradas otras dianas de Cdc2, por lo que los mecanismos mediante los que MPF provoca la fragmentación de la membrana todavía han de ser dilucidados en su totalidad.

La reorganización del citoesqueleto, que culmina en la formación del huso mitótico, se debe a la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (véase Cap. 11). Al comienzo de la profase, los centrosomas se desplazan a lados opuestos del núcleo. Entonces el aumento en la actividad del MPF induce un cambio drástico en la dinámica de los microtúbulos. En primer lugar, aumenta el ritmo de desensamblaje de los microtúbulos, lo que da lugar a que los microtúbulos interfásicos se despolimerizan y acortan. Este desensamblaje parece que se debe a la fosforilación de las proteínas asociadas a microtúbulos, bien por el propio MPF o bien por otras proteína quinasas activadas por el MPF. Además, aumenta el número de microtúbulos que emanan de los centrosomas, por lo que los microtúbulos interfásicos se sustituyen por un gran número de microtúbulos cortos que irradian desde los centrosomas.

La rotura de la envuelta nuclear permite a algunos de los microtúbulos del huso unirse a los cinetocoros de los cromosomas (Fig. 14.26), comenzando entonces el movimiento de los cromosomas que caracteriza a la prometafase. Entre las proteínas que se reúnen en el cinetocoro se incluyen «motores» de microtúbulos, que dirigen el movimiento de los cromosomas hacia los extremos negativos de los microtúbulos del huso, los cuales están anclados al centrosoma. A la acción de estas proteínas que llevan a los cromosomas hacia el centrosoma, se opone el crecimiento de los microtúbulos del huso, que empuja a los cromosomas alejándolos de los polos del huso. Por lo tanto, los cromosomas en la prometafase se agitan hacia delante y hacia atrás entre los centrosomas y la zona media del huso.

Los microtúbulos de los polos opuestos del huso se acaban uniendo a los dos cinetocoros de las cromátidas hermanas (que se localizan en lados opuestos del cromosoma), y el equilibrio de fuerzas que actúa sobre los cromosomas hace que éstos queden alineados en la placa metafásica en la mitad del huso (Fig. 14.27). Como ya se trató en el Capítulo 11, el huso está constituido por **microtúbulos cinetocóricos**, que se unen a los cromosomas, y por **microtúbulos polares**, que se superponen unos con otros en el centro de la célula. Además, los pequeños **microtúbulos astrales** irradian desde los centrosomas hacia la periferia celular.

*Figura 14.26*
**Micrografía electrónica de microtúbulos unidos al cinetocoro de un cromosoma.** (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)



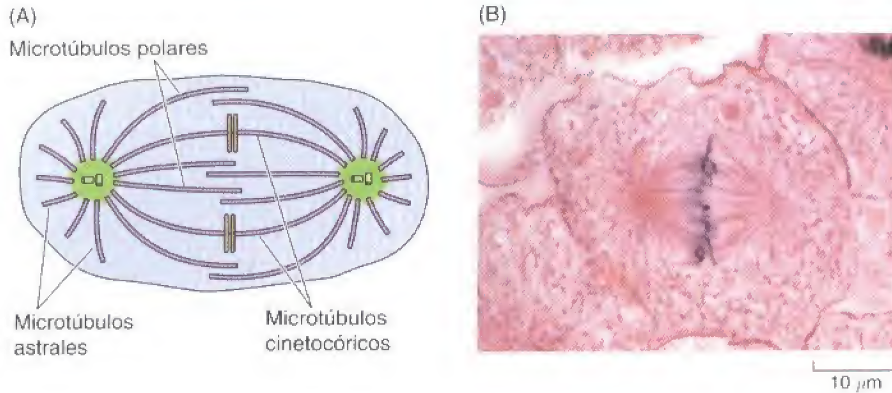



*Figura 14.27*
**Huso metafásico.** (A) El huso está constituido por tres tipos de microtúbulos. Los microtúbulos cinetocóricos se anclan a los cromosomas, los microtúbulos polares se superponen entre sí en el centro de la célula, y los microtúbulos astrales irradian desde el centrosoma hacia la periferia celular. (B) Célula en metafase del pez corégono. (B, Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.).

## *Proteolisis e inactivación del MPF: anafase y telofase*

Como ya se mencionó anteriormente en este Capítulo, un punto de control importante del ciclo celular regula la alineación de los cromosomas en el huso metafásico. Una vez que esto se ha producido, la célula inicia la anafase y completa la mitosis. El paso de la metafase a la anafase se debe a la proteolisis de proteínas reguladoras mediada por las ubiquitinas, la cual se dispara por la activación de una ubiquitina ligasa (véase Fig. 7.39) denominada **complejo promotor de la anafase.** La activación del complejo promotor de la anafase se induce por el MPF al comienzo de la mitosis, por lo que el MPF, en última instancia, provoca su propia destrucción. Sin embargo, el complejo promotor de la anafase permanece inactivo hasta que la célula rebasa el punto de control de la metafase, después del cual la activación del sistema de degradación constituido por las ubiquitinas permite el paso de la metafase a la anafase y la progresión a través del resto de la mitosis.

El punto de control del huso es notable en el sentido de que la presencia de un solo cromosoma no alineado es suficiente para inhibir la activación del complejo promotor de la anafase. A pesar de que todavía no se comprende por completo el mecanismo bioquímico responsable de la operación de este punto de control, parece que los cromosomas no adheridos desencadenan la producción de un complejo de proteínas (denominadas proteínas Mad/Bub) que inhiben al complejo promotor de la anafase (Fig. 14.28). Esta inhibición es liberada una vez que todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados, dando lugar a la activación del complejo promotor de la anafase y a la degradación de dos proteínas diana clave. La puesta en marcha de la anafase se debe a la degradación proteolítica de una proteína denominada Scc1, que es un componente de un complejo de proteínas denominado **cohesinas** que mantienen unidas a las cromátidas hermanas mientras éstas permanecen alineadas en la placa metafásica. La degradación de Scc1 no está catalizada directamente por el complejo promotor de la anafase, sino que éste degrada una proteína reguladora denominada Pds1. La degradación de Pds1 activa otra proteína, denominada Esp1, lo que lleva a la proteolisis de la cohesina Scc1. La rotura de Scc1 rompe la unión entre las cromátidas hermanas, lo que permite su segregación

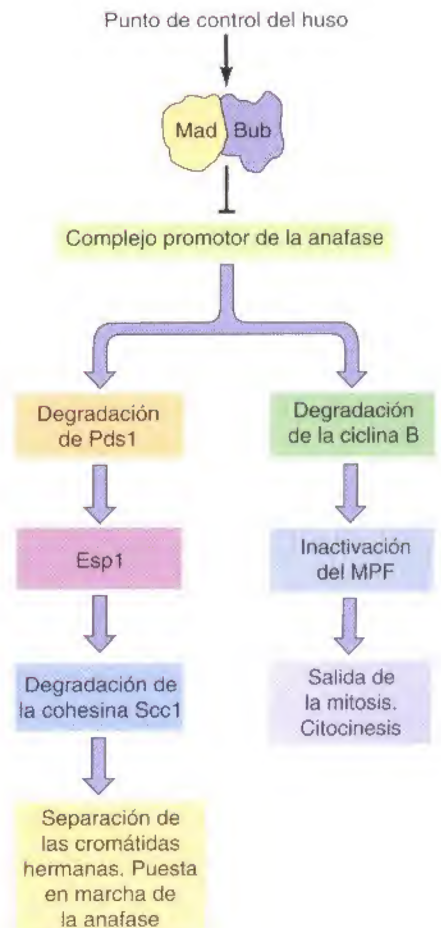



*Figura 14.28*
**Dianas del sistema de la proteolisis de la ciclina B.** El complejo promotor de la anafase es una ubiquitina ligasa que está inhibida por las proteínas Mad/Bud hasta que la célula pasa a través del punto de control del huso. La activación del complejo prmotor de la anafase provoca el paso de metafase a anafase mediante la degradación de la cohesina Scc1, que rompe la unión entre las cromátidas hermanas. El complejo promotor de la anafase también estimula la degradación de la ciclina B, lo que conduce a la inactivación del MPF, a la salida de la mitosis y a la citocinesis.

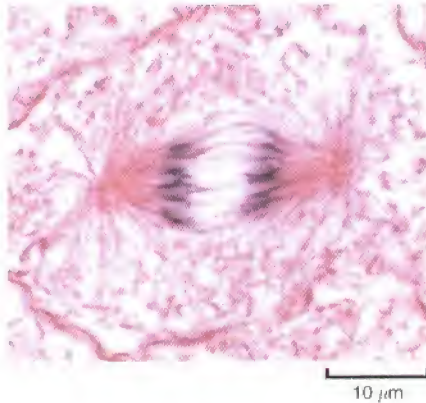



*Figura 14.29*
**Célula de pez corégono en anafase.** (Michael Abbey/ Photo Researchers, Inc.)

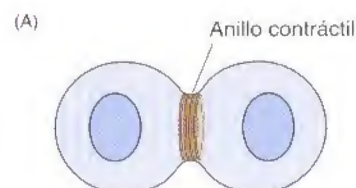
migrando a polos opuestos del huso (Fig. 14.29). La separación de los cromosomas durante la anafase sigue adelante debido a la acción de varios tipos de proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del huso (véanse Figs. 11.48 y 11.49).

La otra proteína reguladora clave que es una diana para la acción de las ubiquitinas y para la degradación por el complejo promotor de la anafase, es la ciclina B. La degradación de la ciclina B provoca la inactivación del MPF, lo que se requiere para que la célula abandone la mitosis y retorne a la interfase. Muchos de los cambios celulares que tienen lugar en estos pasos son sencillamente los procesos inversos a los que induce el MPF durante la entrada en la mitosis. Por ejemplo, el ensamblaje de la envuelta nuclear, la descondensación de la cromatina, y la vuelta de los microtúbulos a un estado interfásico se deben, probablemente, a la pérdida de la actividad del MPF y a la desfosforilación de aquellas proteínas que habían sido fosforiladas por el MPF al principio de la mitosis. Como se verá a continuación, la inactivación del MPF también provoca la citocinesis.

## *Citocinesis*

Normalmente, tras la conclusión de la mitosis se produce la citocinesis, dando lugar a dos células hijas. La citocinesis suele comenzar en la anafase tardía y se desencadena por la inactivación del MPF, lo que coordina la división nuclear con la división citoplasmática de la célula. Como ya se vio en el Capítulo 11, la citocinesis de las células animales se produce mediante un **anillo contráctil** de filamentos de actina y miosina II que se forma debajo de la membrana plasmática (Fig. 14.30). La localización de este anillo queda determinada por la posición del huso mitótico, por lo que la célula se divide por un plano que pasa a través de la placa metafásica, perpendicular al huso. A medida que los filamentos de actina y miosina se contraen, estos tiran de la membrana plasmática, lo que hace que la célula se estrangule y quede dividida en dos. A continuación, se rompe el puente entre las dos células hijas, y la membrana plasmática se vuelve a sellar.

El mecanismo de la citocinesis es diferente en las células de las plantas superiores, ya que éstas están rodeadas por una pared celular rígida. En vez de ser estranguladas y divididas en dos por el anillo contráctil, estas células se dividen mediante la formación de una nueva pared celular y de una nueva membrana plasmática dentro de la célula (Fig. 14.31). En la telofase temprana, vesículas del aparato de Golgi que portan precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos del huso y se acumulan en el lugar de la placa metafásica. Entonces estas vesículas se fusionan formando una estructura grande, en forma de disco y envuelta por membrana, acumulándose su contenido de polisacáridos y dando lugar a la matriz de la nueva pared celular (denominada **placa celular**). La placa



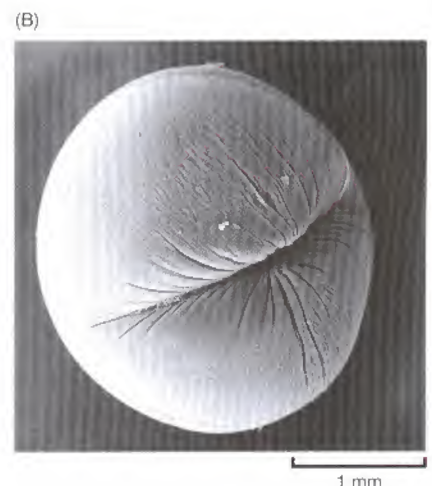




*Figura 14.30*
**Citocinesis de las células animales.** (A) La citocinesis se produce por la contracción de un anillo de filamentos de actina y miosina que estrangula a la célula dividiéndola en dos. (B) Micrografía electrónica de barrido de un huevo de rana que está sufriendo la citocinesis. (B, David M. Phillips/ Visuals Unlimited.)

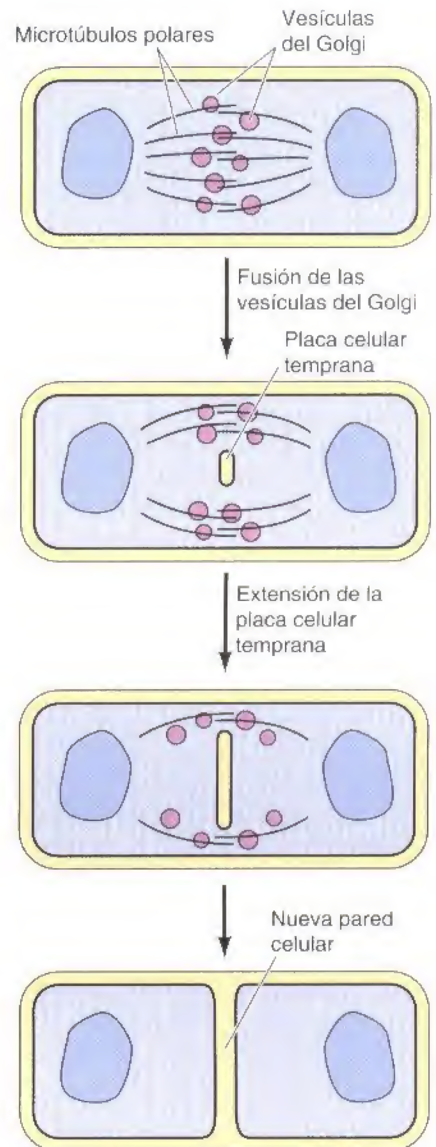



*Figura 14.31*
**Citocinesis en las plantas superiores.** Las vesículas del Golgi que contienen precursores de la pared celular se unen a los microtúbulos polares, en el lugar donde se encontraba la placa metafásica. La fusión de estas vesículas da lugar a una estructura con forma de disco, rodeada de membrana (la placa celular temprana) que crece hacia afuera y que se funde con la membrana plasmática parental.

celular se extiende hacia afuera, perpendicular al huso, hasta que alcanza a la membrana plasmática. Entonces la membrana que rodea la placa celular se funde con la membrana plasmática parental, dividiéndose la célula en dos.

## Meiosis y fecundación

Los ciclos de las células somáticas tratados hasta el momento en este Capítulo, daban lugar a dos células hijas diploides con una dotación genética idéntica. Por el contrario, la meiosis es un tipo de ciclo celular especializado que reduce el número de cromosomas a la mitad, dando lugar a células hijas haploides. Los eucariotas unicelulares, como las levaduras, pueden sufrir meiosis así como reproducirse por mitosis. Por ejemplo, la levadura diploide *Saccharomyces cerevisiae* sufre la meiosis y produce esporas cuando se encuentra en condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, en las plantas y en los animales pluricelulares la meiosis sólo se produce en las células germinales, donde resulta esencial para la reproducción sexual. Mientras que las células somáticas realizan la mitosis para proliferar, en las células germinales tiene lugar la meiosis para producir gametos haploides (el espermatozoide y el óvulo). El desarrollo de un nuevo organismo comienza con la fusión de estos gametos en la fecundación.

### *Proceso de la meiosis*

A diferencia de la mitosis, la **meiosis** supone la división de una célula parental diploide en una progenie haploide, de tal manera que cada célula contiene sólo un miembro del par de cromosomas homólogos presentes en el progenitor diploide (Fig. 14.32). Esta reducción en el número de cromosomas se realiza mediante dos rondas consecutivas de división nuclear y celular (denominadas meiosis I y meiosis II), que ocurren tras una única ronda de replicación del ADN. Al igual que la mitosis, la meiosis I comienza después de que finalice la fase S y de que los cromosomas parentales se hayan replicado para producir cromátidas hermanas idénticas. Sin embargo, el patrón de la segregación de los cromosomas en la meiosis I es muy diferente al de la mitosis. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos primero se emparejan unos con otros y luego segregan a células hijas diferentes. Las cromátidas hermanas permanecen unidas, por lo que tras la meiosis I se obtienen células hijas que contienen un único miembro de cada par cromosómico (cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas). Tras la meiosis I se produce la meiosis II, que se asemeja a la mitosis en que las cromátidas hermanas se separan y segregan a diferentes células hijas. Por lo tanto, la meiosis II da como resultado cuatro células hijas haploides, cada una de las cuales contiene una copia de cada cromosoma.

El apareamiento de los cromosomas homólogos tras la replicación del ADN no sólo es un proceso clave que subyace a la segregación de los cromosomas en la meiosis, sino que también permite la recombinación entre los cromosomas de origen paterno y materno. Este emparejamiento crucial de los cromosomas homólogos tiene lugar durante una larga profase en la meiosis I, que se divide en cinco etapas (**leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno** y **diacinesis**) en función de la morfología cromosómica (Fig. 14.33). La recombinación se produce con una elevada frecuencia durante la meiosis, y se inicia por roturas de doble hebra que se inducen en la profase temprana meiótica (leptoteno) por la acción de una endonucleasa altamente conservada denominada Spo11. Como se estudió en el Capítulo 5, la formación de roturas de doble hebra lleva a la

Meiosis I

Meiosis II

Célula diploide

Replicación del ADN

Apareamiento de los cromosomas homólogos

Cuatro células haploides

Mitosis

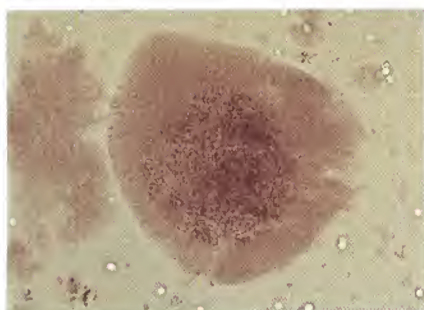
Célula diploide

Replicación del ADN

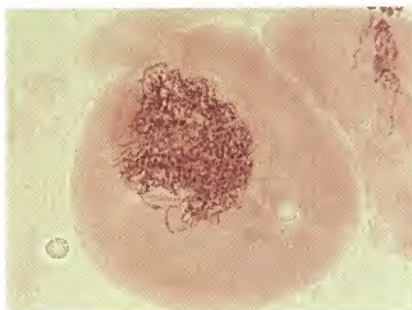
Dos células diploides

*Figura 14.32*
**Comparación de la meiosis y la mitosis.** Tanto la meiosis como la mitosis comienzan tras la replicación del ADN, por lo que cada cromosoma está constituido por dos cromátidas hermanas. En la meiosis I, los cromosomas homólogos se aparean y entonces segregan a células diferentes. Durante la meiosis II las cromátidas hermanas se separan, lo que se asemeja a una mitosis normal. Por lo tanto, la meiosis da lugar a cuatro células hijas haploides.

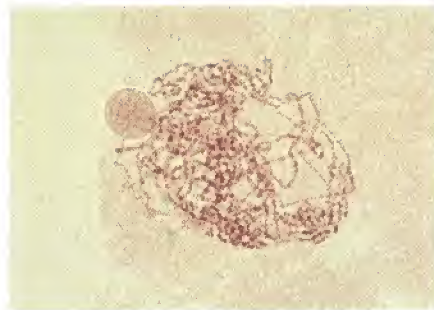
Leptoteno



Zigoteno



Paquiteno



Diploteno



Diacinesis



*Figura 14.33*
**Etapas de la profase de la meiosis I.** Micrografías que muestran la morfología de los cromosomas del lirio. (C. Hasenkampf/ Biological Photo Service.)

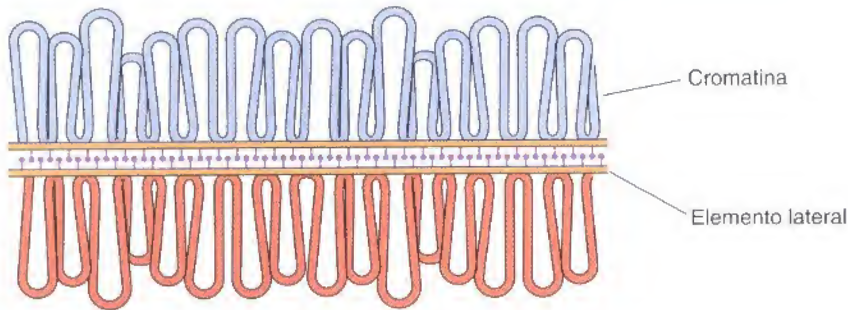



*Figura 14.34*
**Complejo sinaptonémico.** Los bucles de cromatina se anclan a los elementos laterales, que están unidos mediante un elemento central con una estructura a modo de cremallera.

formación de regiones de hebra sencilla que invaden un cromosoma homólogo mediante el apareamiento de bases complementarias (véase Fig. 5.36). La asociación estrecha de los cromosomas homólogos (**sinapsis**) comienza durante la etapa de zigoteno. Durante esta etapa una estructura proteica a modo de cremallera, denominada complejo **sinaptonémico**, se forma a lo largo de los cromosomas apareados (Fig. 14.34). Este complejo mantiene a los cromosomas homólogos estrechamente unidos y alineados el uno con el otro durante la etapa de paquiteno, que se puede prolongar durante varios días. La recombinación entre los cromosomas homólogos se completa durante su asociación en la etapa de paquiteno, permaneciendo los cromosomas unidos en los lugares del sobrecruzamiento (**quiasmas**). Los complejos sinaptonémicos desaparecen en la etapa de diploteno, y los cromosomas homólogos se separan. Sin embargo, es importante destacar que permanecen unidos en los quiasmas, lo que es esencial para que se alineen correctamente en la metafase. Llegado este punto, cada par cromosómico (denominado bivalente) está constituido por cuatro cromátidas con quiasmas visibles (Fig. 14.35). La diacinesis, la etapa final de la profase I, supone la transición a la metafase, durante la que los cromosomas se condensan por completo.

Durante la metafase I, los cromosomas bivalentes se alinean en el huso. A diferencia de la mitosis (véase Fig. 14.27), los cinetocoros de las cromátidas hermanas están adyacentes el uno al otro y se orientan en la misma dirección, mientras que los cinetocoros de los cromosomas homólogos están dirigidos hacia los polos opuestos del huso (Fig. 14.36). Por lo tanto, los microtúbulos del mismo polo del huso se unen a las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos de polos opuestos se unen a los cromosomas homólogos. La anafase I comienza con la rotura de los quiasmas por los que se mantienen unidos los cromosomas homólogos. Entonces los cromosomas homólogos se separan, mientras que las cromátidas hermanas permanecen unidas por sus centrómeros. Por lo tanto, tras finalizar la meiosis I, cada célula hija ha recibido un miembro de cada par de homólogos, constituido por dos cromátidas hermanas.

La meiosis II comienza inmediatamente después de la citocinesis, normalmente antes de que los cromosomas se hayan descondensado por completo. A diferencia de la meiosis I, la meiosis II se asemeja a una mitosis normal. En la metafase II, los cromosomas se alinean en el huso de tal manera que los micro-



*Figura 14.35*
**Cromosoma bivalente en la etapa de diploteno.** El cromosoma bivalente está constituido por los cromosomas homólogos apareados. Las cromátidas hermanas de cada cromosoma se unen por el centrómero. Las cromátidas de los cromosomas homólogos se unen por los quiasmas, que son los sitios donde se ha producido la recombinación genética. (B. John/Visuals Unlimited.)

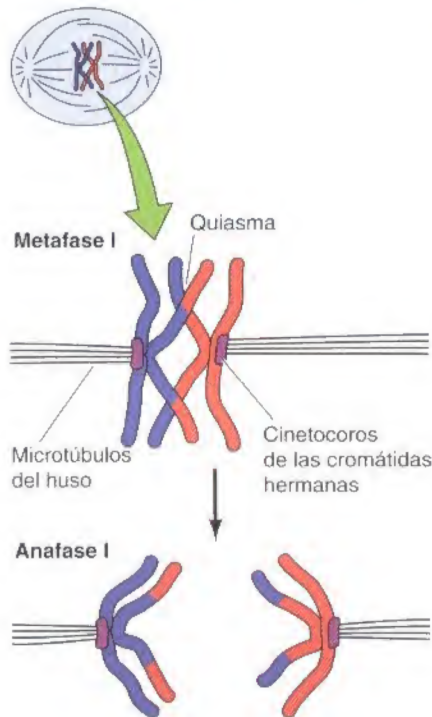



*Figura 14.36*
**Segregación cromosómica en la meiosis I.** En la metafase I, los cinetocoros de las cromátidas hermanas se encuentran fusionados o adyacentes el uno al otro. Los microtúbulos procedentes del mismo polo del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas, mientras que los microtúbulos procedentes de polos opuestos se anclan a los cinetocoros de cromosomas homólogos. Los quiasmas se rompen en la anafase I y los cromosomas homólogos migran a polos opuestos del huso.

túbulos de los polos opuestos del huso se unen a los cinetocoros de las cromátidas hermanas. La unión entre los centrómeros de las cromátidas hermanas se rompe en la anafase II, y las cromátidas hermanas segregan a polos opuestos. A continuación se produce la citocinesis, dando lugar a células hijas haploides.

## *Regulación de la meiosis en los oocitos*

Los oocitos (óvulos en desarrollo) de los vertebrados han sido modelos especialmente útiles para investigar el ciclo celular debido, en gran parte, a su gran tamaño y a que se manipulan facilmente en el laboratorio. Un claro ejemplo de esto, que ya se trató anteriormente en este Capítulo, lo proporciona el descubrimiento y la posterior purificación del MPF de oocitos de rana. La meiosis de estos oocitos, al igual que la de otras especies, se regula en dos únicos puntos del ciclo celular, y los estudios sobre la meiosis de los oocitos han dado a conocer nuevos mecanismos de control del ciclo celular.

El primer punto de regulación de la meiosis de los oocitos aparece en la etapa de diploteno de la primera división meiótica (Fig. 14.37). Los oocitos pueden permanecer detenidos en esta etapa durante largos períodos de tiempo —hasta 40 o 50 años en el ser humano—. Mientras permanecen detenidos en diploteno, los cromosomas de los oocitos se descondensan y se transcriben activamente. Esta actividad transcripcional se refleja en el gran crecimiento de los oocitos durante este período. Por ejemplo, los oocitos humanos tienen cerca de 100 $\mu$m de diámetro (más de cien veces el volumen de una célula somática típica). Los oocitos de rana son incluso mayores, con diámetros aproximadamente de 1 mm. Durante este periodo de crecimiento celular los oocitos acumulan gran cantidad de material de reserva, incluyendo ARNs y proteínas, que se necesitan para mantener el desarrollo temprano del embrión. Como ya se mencionó anteriormente en este Capítulo, los ciclos celulares embrionarios tempranos tienen lugar sin que se produzca crecimiento celular, dividiéndose el óvulo fecundado rápidamente en células más pequeñas (véase Fig. 14.2).

Los oocitos de las diferentes especies varían respecto a cuándo se reanuda la meiosis y tiene lugar la fecundación. En algunos animales, los oocitos permanecen detenidos en la etapa de diploteno hasta que son fecundados, y sólo entonces prosigue la meiosis. Sin embargo, los oocitos de la mayoría de los vertebrados (incluyendo las ranas, los ratones, y los humanos) reanudan la meiosis en repuesta a una estimulación hormonal y prosiguen a través de la meiosis I antes de la fecundación. La división celular tras la meiosis I es asimétrica, dando lugar a un **cuerpo polar** pequeño y a un oocito que mantiene su gran tamaño. Entonces el oocito se dispone a entrar en la meiosis II sin haber reconstituido el núcleo o sin que se hayan descondensado sus cromosomas. La mayoría de los oocitos de los vertebrados se vuelve a detener en la metafase II, donde permanecen hasta la fecundación.

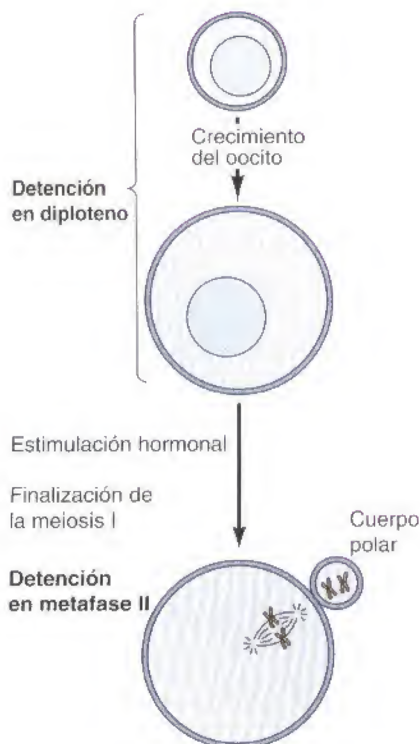



*Figura 14.37*
**Meiosis de los oocitos de los vertebrados.** La meiosis se detiene en la etapa de diploteno, durante la que los oocitos crecen hasta alcanzar un gran tamaño. Entonces los oocitos reanudan la meiosis en respuesta a la estimulación hormonal y completan la primera división meiótica, en la que una citocinesis asimétrica da lugar a un cuerpo polar pequeño. La mayoría de los oocitos de los vertebrados vuelve a detenerse en la metafase II.

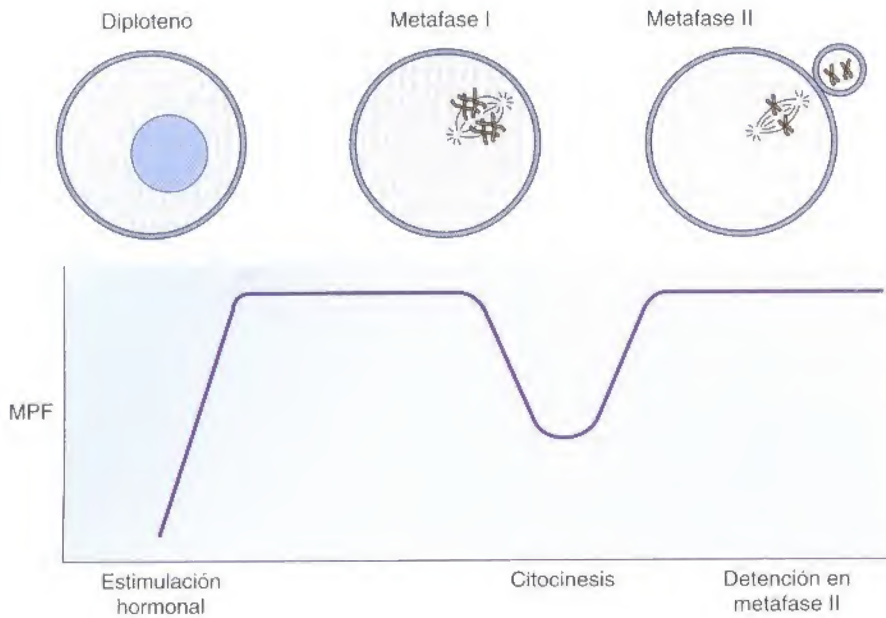



*Figura 14.38*
**Actividad del MPF durante la meiosis de los oocitos.** La estimulación hormonal de los oocitos en diploteno activa al MPF, lo que da lugar a que se pase a la metafase I. Entonces la actividad del MPF disminuye en la transición de metafase I a anafase I. Una vez que se ha completado la meiosis I, aumenta de nuevo la actividad del MPF y permanece elevada durante la detención en metafase II.

Al igual que la fase M de las células somáticas, la meiosis de los oocitos es controlada por el MPF. Sin embargo, la regulación del MPF durante la meiosis de los oocitos manifiesta características únicas que son responsables de la detención en la metafase II (Fig. 14.38). La estimulación hormonal de los oocitos detenidos en diploteno hace que se reanude la meiosis al activar a MPF, al igual que sucede en el paso de $G_2$ a M en las células somáticas. Entonces, al igual que en la mitosis, MPF induce la condensación de los cromosomas, la rotura de la envuelta nuclear, y la formación del huso. A partir de aquí, la activación del complejo B promotor de la anafase induce el paso de metafase a anafase de la meiosis I, junto con una disminución en la actividad del MPF. Sin embargo, en contraste con la mitosis, la actividad de MPF sólo se ve parcialmente reducida, de modo que el oocito permanece en la fase M, la cromatina permanece condensada, y las envueltas nucleares no se vuelven a formar. Después de la citocinesis, aumenta de nuevo la actividad de MPF y se mantiene durante el tiempo que el óvulo permanece detenido en metafase II. Por lo tanto, un mecanismo regulador único de los oocitos mantiene la actividad del MPF durante la transición de metafase a anafase de la meiosis I y la subsiguiente detención en metafase II, lo que bloquea el paso de metafase a anafase en la meiosis II y la inactivación del MPF que tendría lugar debido a la proteolisis de la ciclina B durante una fase M normal.

El factor responsable de la detención en la metafase II lo identificaron por primera vez Yoshio Mashui y Clement Markert en 1971, en el mismo conjunto de experimentos que llevaron al descubrimiento del MPF. Sin embargo, en este caso, se inyectó el citoplasma de un huevo que estaba detenido en la metafase II en una célula de embrión temprano que estaba sufriendo ciclos celulares mitóticos (Fig. 14.39). Tras esta inyección del citoplasma del huevo, la célula embrionaria se detuvo en metafase, lo que indicaba que la detención en la metafase se inducía por un factor citoplasmático presente en el huevo. Debido a que este factor detenía la mitosis, se le denominó **factor citostático (CSF)**.

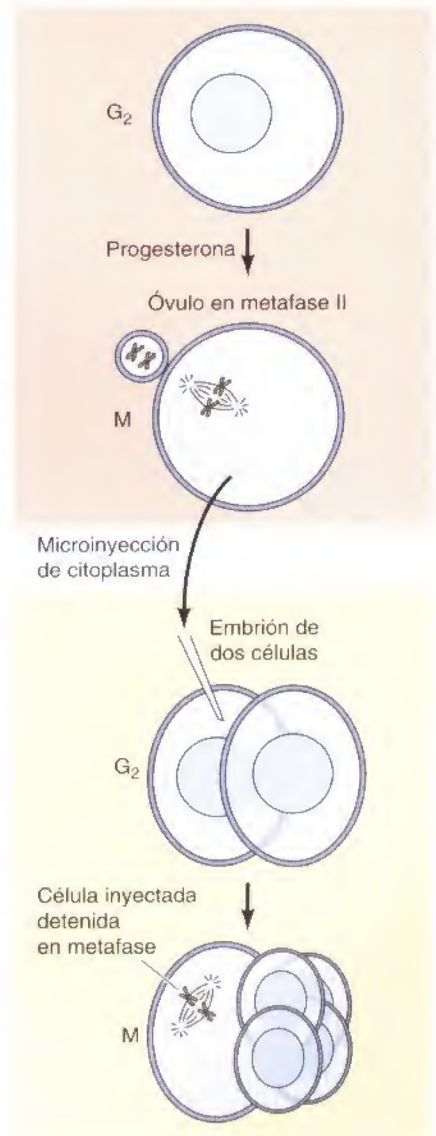



*Figura 14.39*
**Identificación del factor citostático.** Se microinyecta el citoplasma de un óvulo en metafase II en una célula de un embrión constituido por dos células. La célula embrionaria inyectada se detiene en metafase, mientras que la célula que no ha sido inyectada continúa su división. Por lo tanto, un factor en el citoplasma del óvulo en metafase II (factor citostático) ha inducido la detención en metafase de la célula embrionaria inyectada.

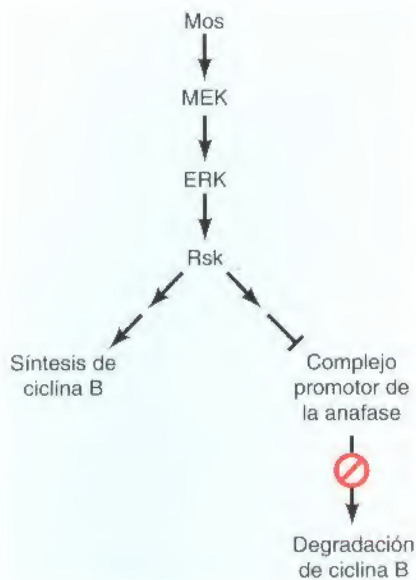



*Figura 14.40*
**Mantenimiento de la actividad de MPF por la proteína quinasa Mos.** La proteína quinasa Mos mantiene la actividad MPF tanto estimulando la síntesis de ciclina B como inhibiendo la degradación de ciclina B por parte del complejo promotor de la anafase. La acción de Mos está mediada por las proteínas quinasas MEK, ERK y Rsk.

Experimentos más recientes han identificado a una proteína serina/treonina quinasa denominada **Mos** como un componente fundamental del CSF. Mos se sintetiza específicamente en los oocitos, alrededor del final de la meiosis I, y entonces se requiere tanto para el incremento de la actividad del MPF durante la meiosis II como para mantener la actividad del MPF durante la detención en metafase II. La acción de Mos se debe a la activación de una quinasa MAP ERK, que desempeña un papel central en las vías de la señalización celular tratadas en el Capítulo anterior. Sin embargo, ERK desempeña un papel diferente en los oocitos; activa otra proteína quinasa denominada Rsk, que mantiene la actividad de MPF tanto inhibiendo la degradación de la ciclina B como estimulando la síntesis de ciclina B (Fig. 14.40). Así, Mos mantiene la actividad de MPF durante la meiosis de los oocitos, desencadenando la detención de los oocitos en metafase II. Los oocitos pueden permanecer detenidos en este punto del ciclo celular meiótico durante muchos días, hasta que sean fecundados.

## Fecundación

En la **fecundación**, el espermatozoide se une a un receptor en la superficie del óvulo y se fusiona con la membrana plasmática de éste, comenzando así el desarrollo de un nuevo organismo diploide que contiene información genética de ambos progenitores (Fig. 14.41). La fecundación no sólo conduce a que se mezclen los cromosomas paternos y maternos, sino que también induce una serie de cambios en el citoplasma del óvulo que son críticos para el desarrollo posterior. Estos cambios activan al óvulo, lo que hace que se complete la meiosis del oocito y que comiencen los ciclos celulares mitóticos del embrión temprano.

Una señal fundamental, debida a la unión del espermatozoide a su receptor en la membrana plasmática del óvulo, es el aumento en el nivel de $Ca^{2+}$ en el citoplasma del óvulo, lo que posiblemente se deba a la activación de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ($PIP_2$) (véase Fig. 13.27). Un efecto de este aumento de $Ca^{2+}$ intracelular es la inducción de alteraciones en la superficie que impiden la entrada de más espermatozoides en el óvulo. Este es un proceso fundamental para asegurar que se forma un embrión diploide normal, puesto que el óvulo permanece expuesto a un elevado número de espermatozoides. Se piensa que estas alteraciones se deben, al menos en parte, a la exocitosis inducida por $Ca^{2+}$ de vesículas secretoras que abundan debajo de la membrana plasmática del óvulo. La liberación de los contenidos de estas vesículas altera la cubierta extracelular del óvulo, de tal manera que se bloquea la entrada de otros espermatozoides.

El aumento del $Ca^{2+}$ citosólico tras la fecundación también es una señal para que se complete la meiosis (Fig. 14.42). En los óvulos que permanecen detenidos en la metafase II, la transición de metafase a anafase se pone en marcha mediante una activación del complejo promotor de la anafase inducida por $Ca^{2+}$. La inactivación del MPF resultante hace que se complete la segunda división meiótica, teniendo lugar una citocinesis asimétrica (al igual que en la meiosis I) y produciendo un segundo cuerpo polar pequeño.

Una vez que se ha completado la meiosis del oocito, el óvulo fecundado (ahora denominado **zigoto**) contiene dos núcleos haploides (denominados **pronúcleos**), cada uno proveniente de un progenitor. En los mamíferos, los dos pronúcleos entran en fase S y replican su ADN a la vez que migran el uno hacia el otro. Cuando se encuentran, el zigoto entra en la fase M de su primera división mitótica. Las dos envueltas nucleares se rompen, y los cromosomas con-

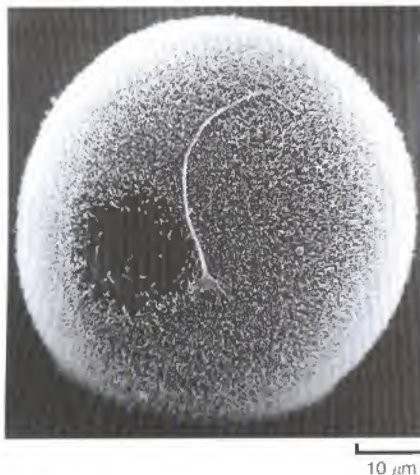



*Figura 14.41*
**Fecundación.** Micrografía electrónica de barrido de un espermatozoide humano fecundando un óvulo. (David M. Philips/Visualas Unlimited.)

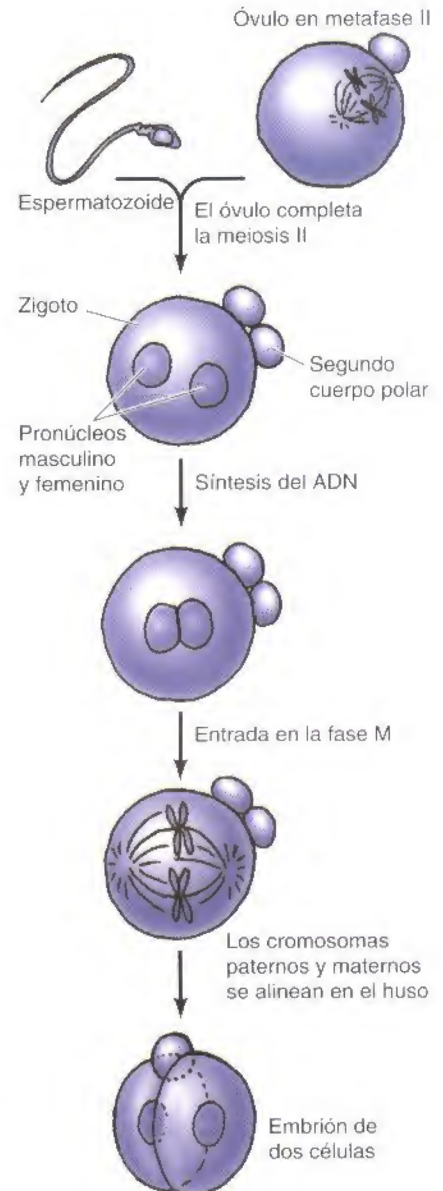



*Figura 14.42*
**Fecundación y finalización de la meiosis.** La fecundación induce el paso de la metafase II a la anafase II, lo que da lugar a que se complete la meiosis del oocito y a la formación de un segundo cuerpo polar (que normalmente degenera). El núcleo del espermatozoide se descondensa, por lo que el óvulo fecundado (zigoto) contiene dos núcleos haploides (pronúcleos masculino y femenino). En los mamíferos, los pronúcleos replican su ADN a medida que se aproximan. Entonces comienza la mitosis, y los cromosomas procedentes de ambos núcleos se alinean en un huso mitótico común. Por lo tanto, tras la mitosis y la citocinesis se obtiene un embrión formado por dos células y cada una de ellas contiene un genoma diploide.

densados de origen paterno y materno se alinean en un mismo huso. El resultado al finalizar la mitosis son dos células embrionarias, cada una con un genoma diploide nuevo. Entonces comienza la serie de divisiones celulares que, en último término, dará lugar al desarrollo de un nuevo organismo.

## Células madre y mantenimiento de tejidos adultos

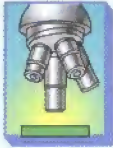
El desarrollo temprano se caracteriza por la rápida proliferación de las células embrionarias, que a partir de un momento determinado se diferencian para dar lugar a los diversos tipos de células especializadas que constituyen los tejidos y órganos de los animales pluricelulares. A medida que las células se diferencian su ritmo de proliferación suele disminuir, y la mayoría de las células en el animal adulto permanecen detenidas en la etapa $G_0$ del ciclo celular. Un número reducido de tipos celulares diferenciados nunca se vuelven a dividir, pero la mayoría de las células pueden reanudar la proliferación cuando se necesita reponer las células que se han perdido debido a una lesión o a la muerte celular. Además, algunas células se dividen continuamente a lo largo de la vida para reponer aquellas células que tienen una tasa de renovación elevada en el animal adulto. Por lo tanto, ha de existir un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular para que se mantenga un número constante de células en los tejidos y órganos adultos.

### *Proliferación de las células diferenciadas*

Las células del animal adulto se pueden clasificar en tres tipos generales en función de su capacidad de proliferación. Un reducido número de tipos celulares diferenciados, como las células del músculo cardíaco en el ser humano, no se dividen. Estas células se generan durante el desarrollo embrionario, se diferencian, y se mantienen durante toda la vida del animal.

Algunos otros tipos de células diferenciadas mantienen la capacidad de proliferar. Estas células entran en la fase $G_0$ del ciclo celular pero resumen la proliferación cuando es necesaria para reemplazar células que han sido dañadas o han muerto. Células de este tipo incluyen a los fibroblastos de la piel, las células del músculo liso, las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos y las células epiteliales de algunos órganos internos, como puede ser el hígado. Un ejemplo de la proliferación controlada de estas células, estudiada anteriormente en este capítulo, es la rápida proliferación de los fibroblastos de la piel para reparar el daño resultante de un corte o una herida. Otro ejemplo llamativo lo proporcionan las células hepáticas, que generalmente sólo se dividen raramente. Sin embargo, si se pierden números elevados de células hepáticas (p. ej., por la extirpación quirúrgica de parte del hígado), las células restantes son estimuladas y proliferan para reemplazar al tejido que falta. Por ejemplo, la extirpación quirúrgica de dos tercios del hígado de una rata está seguida de una rápida proliferación celular, desencadenando la regeneración del hígado completo en pocos días.

Sin embargo, la mayoría de las células completamente diferenciadas ya no son capaces de llevar a cabo la división celular, pero pueden ser reemplazadas por la proliferación de células menos diferenciadas, denominadas células madre, que están presentes en los tejidos de animales adultos. Puesto que retie-



## Experimento clave

# *Cultivo de células madre embrionarias*

**_Aislamiento de una línea celular pluripotencial a partir de embriones tempranos de ratón cultivados en medio condicionado de células madre de teratocarcinoma_**

Gail R. Martin

Universidad de California, San Francisco, CA

*Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1981, Volumen 78, págs. 7634-7638*



Gail R. Martin

### Contexto

Las células de embriones tempranos son únicas en su capacidad de proliferación y diferenciación en todos los tipos de células que componen los tejidos y órganos de los animales adultos. En 1970, se encontró que los embriones tempranos de ratón, con frecuencia desarrollaban tumores cuando eran retirados del útero y trasplantados en un sitio anómalo. Estos tumores, denominados teratocarcinomas, contenían células que eran capaces de formar una gama de tejidos diferentes a medida que crecían en el animal. Además, las células procedentes de los teratocarcinomas (denominadas células de carcinoma embrionario) podían aislarse y crecer en cultivo. Estas células se parecían a las células embrionarias normales y podía inducirse su diferenciación en una variedad de tipos celulares en cultivo. Algunas células de carcinoma embrionario también podían participar en el desarrollo normal de un ratón, si eran inyectadas en embriones tempranos de ratón (blastocistos) y a continuación implantados en una madre adoptiva.

La capacidad de las células de carcinoma embrionario de diferenciarse en una diversidad de tipos celulares y de participar en el desarrollo normal del ratón, sugería que estas células derivadas de tumores podían estar estrechamente emparentadas con las células madre embrionarias normales Sin embargo, los sucesos que ocurrieron durante el establecimiento de teratocarcinomas en ratón eran desconocidos. Gail Martin hipotetizó que las células de carcinoma embrionario encontradas en los teratocarcinomas eran, esencialmente, células embrionarias normales que proliferaban anómalamente debido, sencillamente, a que cuando eran retiradas del útero y trasplantadas a un sitio extraño, no recibían las señales apropiadas para inducir la diferenciación normal. Basándose en esta hipótesis, intentó cultivar células de embriones de ratón con el objetivo de aislar líneas de células madre embrionarias normales. Sus experimentos, junto con un trabajo similar de Martin Evans y Matthew Kaufman (Establecimiento en cultivo de células pluripotenciales a partir de embriones de ratón, *Nature*, 1981, 292: 154-156), demostraron que las células madre podían cultivarse directamente a partir de embriones de ratón normales. El aislamiento de estas líneas de células madre

nen la capacidad de proliferar y sustituir a las células diferenciadas a lo largo de la vida de un animal, las células madre juegan un papel crítico en el mantenimiento de los tejidos adultos.

## *Células madre*

La propiedad crítica de las **células madre** es que se dividen para producir células hijas, las cuales pueden diferenciarse o permanecer como células madre (Fig. 14.43). Ya que la división de las células madre produce nuevas células madre, además de células hijas diferenciadas, las células madre son poblaciones autorrenovadoras que pueden servir como fuente para la producción de células diferenciadas a lo largo de la vida. El papel de las células madre es especialmente evidente en el caso de varios tipos de células epiteliales que revisten el tubo digestivo, que poseen una corta duración de vida y deben ser reemplazadas por la proliferación celular continua en los animales adultos. En todos estos casos, las células completamente diferenciadas no proliferan, pero son renova-

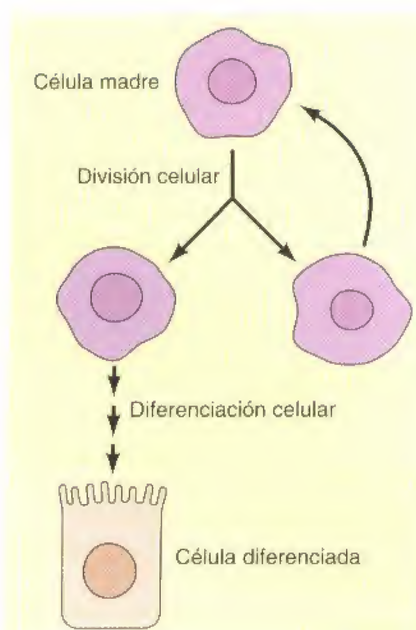
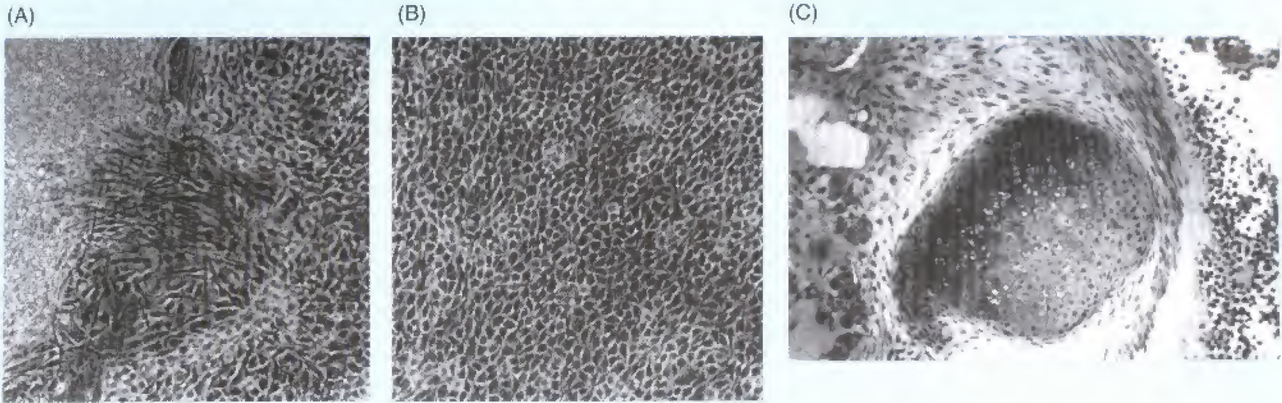



*Figura 14.43*
**Proliferación de las células madre.** Las células madre se dividen para dar lugar a una célula hija que permanece como una célula madre, y a otra célula hija que se diferencia (p. ej., a una célula epitelial intestinal).

## *Cultivo de células madre embrionarias* (continuación)




Las células madre embrionarias se diferencian en cultivo para formar una variedad de tipos celulares, incluyendo células semejantes a neuronas (A), células endodérmicas (B), y cartílago (C).

embrionarias permitió la posterior manipulación genética y el análisis del desarrollo del ratón, además de plantear el posible uso de células madre embrionarias humanas en la terapia de trasplante.

### Experimentos

Basándose en la premisa de que las células de carcinoma embrionarias se derivaban a partir de células madre embrionarias normales, Martin intentó cultivar células a partir de blastocistos normales de ratón. Empezando con las células de aproximadamente 30 embriones, aisló inicialmente cuatro colonias de células en crecimiento tras una semana de cultivo. Estas células podían pasarse repetidamente a cultivos en masa, y podían derivarse, de forma reproducible, en nuevas líneas celulares cuando se repetía el experimento con embriones de ratón adicionales.

Las líneas celulares derivadas a partir de embriones normales (células madre embrionarias) se asemejaban a las células de carcinoma embrionario, derivadas de tumores. Lo más importante es que podía inducirse la diferenciación de las células madre embrionarias en cultivo en una variedad de tipos celulares, incluyendo células endodérmicas, cartílago, y células semejantes a neuronas (ver figura). Es más, si las células madre embrionarias eran inyectadas en un ratón, formaban tumores que contenían múltiples tipos celulares diferenciados. Parecía entonces, que las líneas de células madre embrionarias, que retenían la capacidad de diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares, podían establecerse en cultivo a partir de embriones normales de ratón.

### Impacto

El establecimiento de líneas de células madre embrionarias ha tenido un gran impacto sobre el estudio de la genética y el desarrollo del ratón, además de abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas. Experimentos sucesivos demostraron que las células madre embrionarias podían participar en el desarrollo normal del ratón tras su inyección en embriones murinos. Puesto que podían utilizarse técnicas de transferencia génica para introducir o mutar genes en las células madre embrionarias cultivadas, estas células se han utilizado para investigar el papel de diversos genes en el desarrollo del ratón. Como se estudió en el Capítulo 3, cualquier gen de interés puede ser inactivado en las células madre embrionarias, mediante la recombinación homóloga con un ADN clonado, y el papel de dicho gen en el desarrollo del ratón puede determinarse a continuación, introduciendo las células madre embrionarias alteradas en embriones de ratón.

En 1998, dos grupos de investigadores desarrollaron las primeras líneas de células madre embrionarias humanas. Debido a la capacidad de proliferación y diferenciación de estas células, ofrecen la posibilidad de proporcionar nuevas terapias para el tratamiento de una variedad de enfermedades. A pesar de que el número de problemas técnicos y preocupaciones éticas deben afrontarse, las terapias de trasplante basadas en el empleo de células madre embrionarias, pueden proporcionar la mayor esperanza para el tratamiento de enfermedades como la de Parkinson, Alzheimer, la diabetes y las lesiones de la médula espinal.

das continuamente por la proliferación de células madre que a continuación, se diferencian para mantener un número estable de células diferenciadas.

La producción de células de la sangre es un buen ejemplo del papel de las células madre en el mantenimiento de las poblaciones celulares diferenciadas. Existen diversos tipos de células sanguíneas con funciones especializadas: Los eritrocitos (glóbulos rojos) transportan $O_2$ y $CO_2$; los granulocitos y los macrófagos son células fagocíticas; las plaquetas (que son fragmentos de los megacariocitos) funcionan en la coagulación sanguínea; y los linfocitos son responsa-

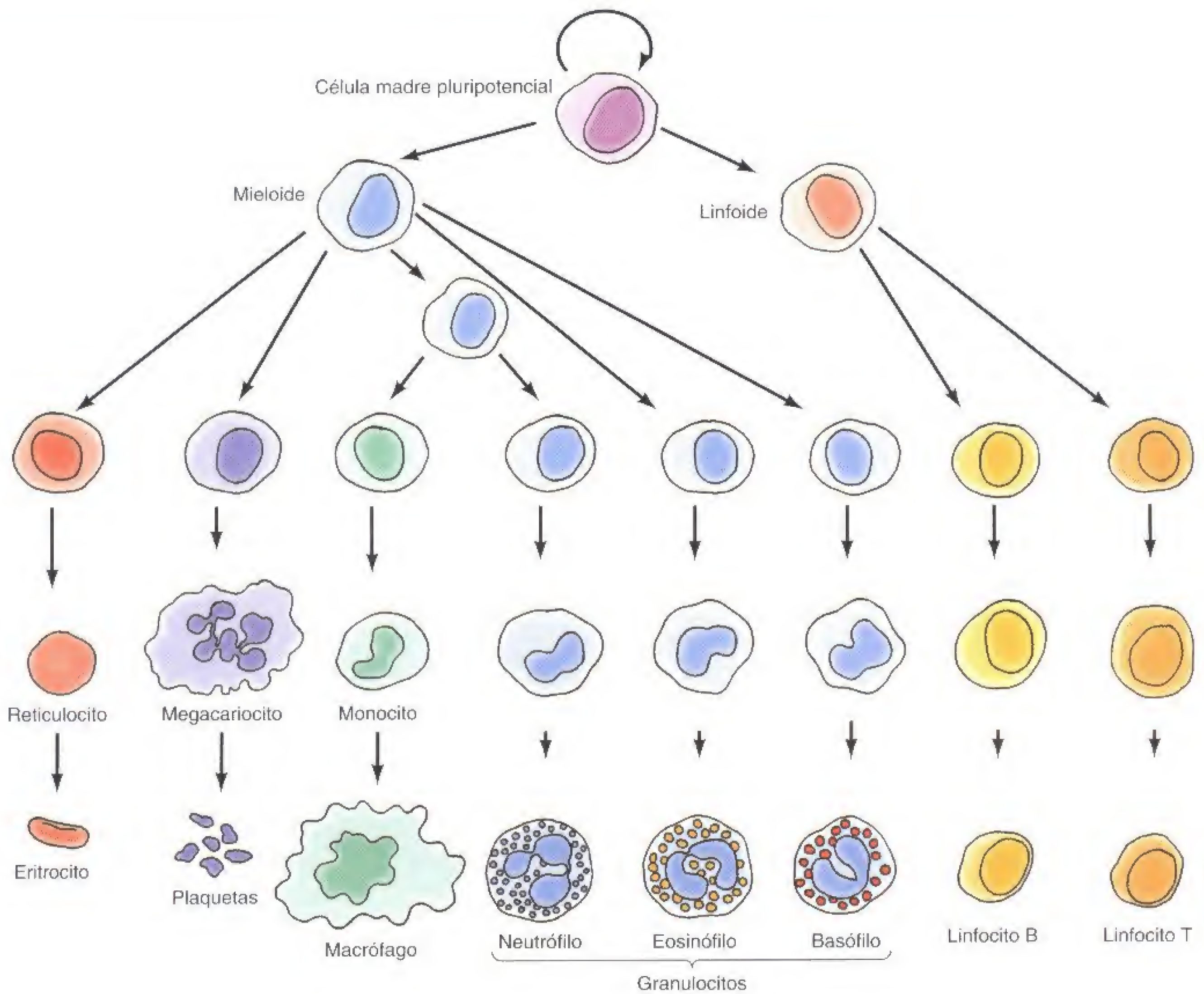



*Figura 14.44*
**Formación de las células sanguíneas.** Los diferentes tipos de células sanguíneas provienen de una célula madre pluripotencial de la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varias rondas de división celular a medida que maduran, pero la proliferación celular cesa cuando se alcanzan los estadios terminales de la diferenciación.

bles de la respuesta inmune. Todas estas células poseen un tiempo de vida limitado, desde menos de un día hasta algunos meses, y son producidas continuamente por la división de una célula madre común (célula madre pluripotencial) en la médula ósea (Fig. 14.44). Los descendientes de la célula madre pluripotencial se comprometen a continuación, en una vía de diferenciación específica. Estas células continúan proliferando y sufren varios ciclos de división a medida que se diferencian. Sin embargo, una vez que se encuentran completamente diferenciadas, cesan su proliferación, de modo que el mantenimiento de las poblaciones de células sanguíneas diferenciadas depende de la continua proliferación de la célula madre pluripotencial.

## Aplicaciones médicas de las células madre

Ya que las células madre pueden replicarse, además de diferenciarse, para dar lugar a una variedad de tipos celulares, son de considerable interés con respec-

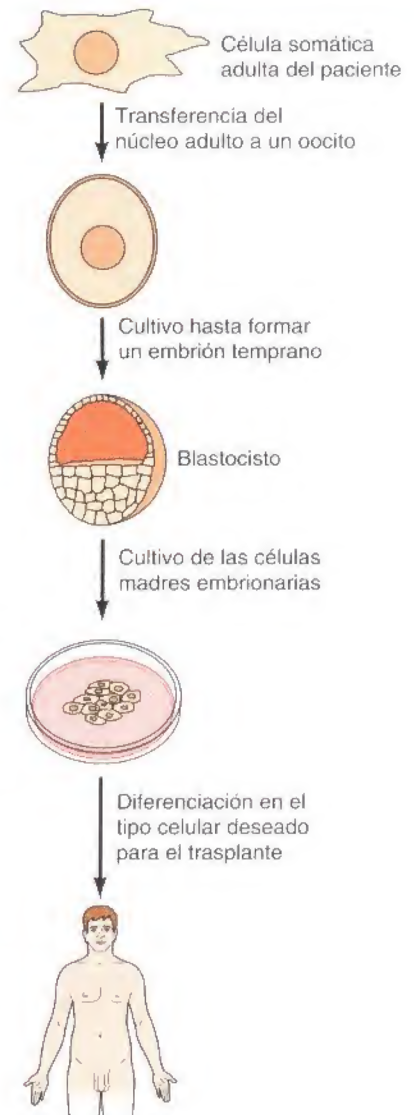



*Figura 14.45*
**Uso potencial de células madre embrionarias en la clonación terapéutica.** En la clonación terapéutica, el núcleo de una célula somática adulta se transferiría a un oocito enucleado, que sería cultivado hasta dar lugar a un embrión temprano. A continuación las células madre embrionarias (ES) podrían derivarse y ser empleadas en la terapia de trasplante. Ya que las células ES serían genéticamente idénticas al receptor del trasplante (que fue el donante del núcleo adulto), se evitarían las complicaciones debidas al rechazo inmunológico.

to a sus potenciales aplicaciones médicas. Por ejemplo, puede ser posible emplear las células madre para tratar una variedad de enfermedades humanas y reparar los tejidos dañados. Las células madre con la capacidad de diferenciación más amplia son las **células madre embrionarias (células ES: *embryonic stem*)** que están presentes en los embriones tempranos y pueden dar lugar a todos los tipos celulares diferenciados de los organismos adultos. Como se vio en el Capítulo 3, estas células pueden ser cultivadas a partir de embriones de ratón y utilizadas para introducir genes alterados en los ratones (ver Fig. 3.36). En 1998, dos grupos de investigadores publicaron el aislamiento de células ES a partir de embriones humanos, sugiriendo la posibilidad de que estas células madre humanas pudieran ser utilizadas para aplicaciones médicas.

El aislamiento de células madre embrionarias humanas, siguió a la primera demostración, en 1997, de que el núcleo de una célula adulta podía dar lugar a un animal clonado viable (en este caso, un cordero) tras su trasplante en un oocito. La transferencia de núcleos de células somáticas adultas a oocitos ha sido utilizada para crear descendencia clonada de una variedad de especies, incluyendo ovejas, ratones, cerdos, ganado vacuno, cabras, conejos y gatos. Puesto que las células madre embrionarias pueden obtenerse a partir de embriones que se han producido por la transferencia de núcleos adultos en oocitos, estas observaciones sugieren la posibilidad de la **clonación terapéutica** (Fig. 14.45). En la clonación terapéutica, un núcleo de una célula humana adulta sería transferido a un oocito y se emplearía para producir un embrión temprano en cultivo. Las células ES cultivadas a partir de un embrión así clonado podrían, en principio, emplearse para generar los tipos apropiados de células diferenciadas para la terapia de trasplante. Las células diferenciadas obtenidas por este procedimiento serían genéticamente idénticas al receptor del trasplante (que fue el donante del núcleo de la célula somática adulta), impidiendo las complicaciones potenciales de un rechazo inmunológico.

La posibilidad de dicha terapia de trasplante ofrece esperanza para el tratamiento de una variedad de trastornos devastadores, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes y lesiones de la médula espinal. Aunque se ha obtenido un cierto éxito en modelos animales, deben superarse obstáculos mayores antes de que la clonación terapéutica pueda aplicarse en el hombre. Son necesarias mejoras sustanciales en los métodos empleados para generar embriones mediante la transferencia nuclear, y será necesario desarrollar procedimientos que diferencien fiablemente a las células ES en los tipos celulares apropiados, antes del trasplante. El desarrollo de la clonación terapéutica también conlleva cuestiones éticas, no sólo con respecto a la posibilidad de clonar seres humanos (**clonación reproductiva**), sino también con respecto a la destrucción de embriones que sirven como fuente de células ES. Se ha sugerido que las células madre aisladas a partir de tejidos adultos podrían emplearse en lugar de células ES para la sustitución de tejidos, pero la capacidad de proliferación y el potencial de desarrollo de las células madre adultas parecen limitadas en comparación con las células ES. Mientras que muchos retos aún persisten, la investigación sobre células madre es una gran esperanza para abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades humanas.

| PALABRAS CLAVE | RESUMEN |
|---|---|
| | **CICLO CELULAR EUCARIOTA** |
| **mitosis, interfase, citocinesis, fase M, fase $G_1$, fase S, fase $G_2$, $G_0$, citómetro de flujo, separador celular de fluorescencia** | ***Fases del ciclo celular:*** El ciclo celular de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, $G_1$, S, y $G_2$. La fase M consiste en la mitosis, a la que suele seguir la citocinesis. La fase S es el periodo de la replicación del ADN. |
| **START, punto de restricción** | ***Regulación del ciclo celular por el crecimiento celular y por señales extracelulares:*** Las señales extracelulares y el tamaño de la célula regulan la progresión a través de los puntos de control específicos del ciclo celular. |
| **punto de control del ciclo celular, p53** | ***Puntos de control del ciclo celular:*** Los puntos de control y el control por retroalimentación, coordinan los procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular y detienen el transcurso del ciclo celular si el ADN resulta dañado. |
| | ***Restringir la replicación del ADN a una vez por ciclo celular:*** Una vez que se ha realizado la replicación del ADN, se impide el comienzo de una nueva fase S hasta que la célula haya completado la mitosis. |
| | **REGULADORES DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR** |
| **factor promotor de la maduración (MPF), Cdc2, ciclina** | ***MPF: Un dímero de Cdc2 y ciclina:*** El MPF es la molécula clave responsable de regular el paso de $G_2$ a M en todos los eucariotas. El MPF es un dímero constituido por la ciclina B y por la proteína quinasa Cdc2. |
| **$G_1$, Ciclina, Cln, Cdk, Inhibidor de Cdk (CKI)** | ***Familias de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas:*** Distintas parejas constituidas por ciclinas y proteína quinasas relacionadas con Cdc2 regulan la progresión a través de las diferentes etapas del ciclo celular. La actividad de las Cdk's se regula mediante su asociación con las ciclinas, mediante fosforilaciones activadoras e inhibidoras, y mediante la unión de inhibidores de Cdk. |
| **Rb, gen supresor de tumores, E2F** | ***Factores de crecimiento y ciclinas de tipo D:*** Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células animales induciendo la síntesis de ciclinas de tipo D. Entonces los complejos Cdk4,6/ciclina D intervienen llevando a las células a través del punto de restricción en $G_1$. Un sustrato clave de los complejos Cdk4,6/ciclina D es la proteína supresora de tumores Rb, que regula la transcripción de genes que se requieren para la continuación del ciclo celular. |
| | ***Inhibidores de la progresión del ciclo celular:*** el daño al ADN y diversas señales extracelulares inhiben la progresión del ciclo celular. Estos factores de inhibición suelen inducir la síntesis de inhibidores de Cdk |
| | **SUCESOS DE LA FASE M** |
| **profase, metafase, anafase, telofase, centrómero, cinetocoro, centrosoma, huso mitótico, prometafase** | ***Etapas de la mitosis:*** Clásicamente, la mitosis se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Los procesos fundamentales de la mitosis incluyen la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, la rotura de la envuelta nuclear, y la unión de los microtúbulos del huso al cinetocoro de los cromosomas. Entonces las cromátidas hermanas se separan y migran a los polos opuestos del huso. Por último, se vuelven a formar los núcleos, los cromosomas se descondensan y la citocinesis divide a la célula en dos. |
| **microtúbulo cinetocórico, microtúbulo polar, microtúbulo astral** | ***MPF y progresión a la metafase:*** la fase M comienza por la activación del MPF, que fosforila otras proteína quinasas así como a láminas nucleares y a condensinas. La activación del MPF es la responsable de la condensación de la cromatina, de la rotura de la envuelta nuclear, de la fragmentación del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, y de la reorganización de los microtúbulos para formar el huso mitótico. El anclaje de los microtúbulos del huso a los cinetocoros de las cromátidas hermanas conducirá a que éstas se alineen en la placa metafásica. |

***Proteolisis e inactivación del MPF: anafase y telofase:*** La activación de una ubiquitina ligasa denominada complejo promotor de la anafase provoca la degradación de proteínas reguladoras clave en la transición de la metafase a la anafase. La proteolisis mediada por ubiquitinas, que la inició el complejo promotor de la anafase, induce la degradación de la cohesina, lo que rompe la unión entre las cromátidas hermanas al inicio de la anafase. La activación del complejo promotor de la anafase también induce la degradación de la ciclina B y la inactivación del MPF, lo que da lugar a la reconstitución de la envuelta nuclear, la descondensación de la cromatina, y el retorno de los microtúbulos a la situación interfásica.

**complejo promotor de la anafase, cohesina**

***Citocinesis:*** La inactivación del MPF también induce la citocinesis. En las células animales la citocinesis se produce debido a la contracción de un anillo constituido por filamentos de actina y miosina. En las células de los vegetales superiores la citocinesis se lleva a cabo mediante la formación de una pared celular y de una membrana plasmática nueva en el interior de la célula.

**anillo contráctil, placa celular**

## MEIOSIS Y FECUNDACIÓN

***Proceso de la meiosis:*** La meiosis es un ciclo celular especializado que da lugar a células hijas haploides. A una única ronda de replicación del ADN le siguen dos divisiones celulares consecutivas. Durante la meiosis I los cromosomas homólogos primero se aparean y luego segregan a células hijas diferentes. La meiosis II se asemeja a una mitosis normal, en la que se separan las cromátidas hermanas.

**meiosis, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno, diacinesis, sinapsis, complejo sinaptonémico, quiasma**

***Regulación de la meiosis en los oocitos:*** La meiosis de los oocitos de los vertebrados se regula en dos únicos sitios del ciclo celular: en la fase de diploteno en la meiosis I, y en la metafase en la meiosis II. La detención en la metafase II se debe a que el factor promotor de la mitosis es inhibido por una proteína quinasa que se expresa en los oocitos.

**cuerpo polar, factor citostático (CSF), Mos**

***Fecundación:*** La fecundación induce la reanudación de la meiosis en el oocito mediante una activación, dependiente de $Ca^{2+}$, del complejo promotor de la anafase. El óvulo fecundado contendrá dos núcleos haploides que formarán un nuevo genoma diploide, y comenzarán las divisiones celulares embrionarias.

**fecundación, zigoto, pronúcleo**

## PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO Y EN LA DIFERENCIACIÓN

**célula madre**

***Proliferación de las células diferenciadas:*** La mayoría de las células en el animal adulto se encuentran detenidas en la fase $G_0$ del ciclo celular. Un número reducido de tipos de células diferenciadas ya no son capaces de proliferar, pero la mayoría sí proliferarán cuando se requiera que repongan a aquellas células que se hayan perdido debido a una lesión o a la muerte celular.

***Células madre:*** La mayoría de las células diferenciadas no proliferan ellas mismas, sino que se reponen a través de la proliferación de células madre. Las células madre se dividen dando lugar a una célula hija que se diferencia y a otra que permanece como célula madre.

***Aplicaciones médicas de las células madre:*** Debido a que las células madre pueden proliferar y diferenciarse en una diversidad de tipos celulares, pueden ser útiles como fuente de células para la terapia de trasplante. Las células madre embrionarias poseen el mayor potencial de proliferación y diferenciación. Combinado con procedimientos de transferencia de núcleos de células somáticas a oocitos, estas células ofrecen la posibilidad de la clonación terapéutica para la terapia de trasplante en una variedad de enfermedades devastadoras.

**célula madre embrionaria (célula ES), clonación terapéutica, clonación reproductiva**

## Preguntas

1. ¿En qué se parecen las células en $G_0$ y $G_1$? ¿En qué difieren?

2. Considérese una célula de mamífero que se divide cada 30 horas. La observación al microscopio indica que, en un momento dado, se encuentran en mitosis el 3,3 % de las células. Tras el análisis por el citómetro de flujo se establece que el 53,3 % de las células tiene una cantidad de ADN de 2*n*, el 16,7 % tiene una cantidad de 4*n*, y el 30 % tiene una cantidad que oscila entre 2*n* y 4*n*. ¿Cuál es la duración de las fases $G_1$, S, $G_2$ y M del ciclo de estas células?

3. La radiación daña al ADN y detiene la progresión del ciclo celular en puntos de control en $G_1$, S y $G_2$. ¿Por qué resulta ventajoso para las células dañadas?

4. El punto de control del huso retrasa el comienzo de la anafase hasta que todos los cromosomas se encuentran correctamente alineados sobre el huso. ¿Cuál sería el resultado si un fallo de este punto de control permitiese que se iniciara la anafase mientras uno de los cromosomas todavía se encontrase unido a los microtúbulos de un único centrosoma?

5. El inhibidor de Cdk, p16, se une de manera específica a los complejos Cdk4,6/ciclina D. ¿Cuál sería el efecto esperado de una sobreexpresión de p16 sobre la progresión del ciclo celular? ¿Afectaría la sobreexpresión de p16 a una célula tumoral que careciera de la proteína Rb funcional?

6. La mutagénesis *in vitro* de ADNc de lámina clonados se ha utilizado para producir mutantes que no pueden ser fosforilados por MPF. ¿Cómo afectaría la expresión de estas lamininas mutantes a la ruptura de la envuelta nuclear al final de la profase?

7. ¿Cuáles son los sustratos de MPF, cuya fosforilación dependiente de ciclina B desencadena la entrada en mitosis?

8. Se han generado mutantes de la ciclina B que son resistentes a la degradación por la proteasa de la ciclina B. ¿Cómo afectaría la expresión de estas ciclinas B mutantes a la transición de la metafase a la anafase?

9. Se ha utilizado la recombinación homóloga para inactivar el gen *mos* en ratones. ¿Qué se esperaría que causara esto en la meiosis de los oocitos?

10. ¿Cómo proporciona el óvulo fertilizado un bloqueo duradero a la entrada adicional de espermatozoides en el óvulo?

11. ¿Qué es una célula madre?

## Bibliografía


### *Ciclo celular eucariota*

Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15: 2177–2196. [R]

Blow, J. J. and B. Hodgson. 2002. Replication licensing—defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.* 12: 72-78. [R]

Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672. [R]

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 227-256. [R]

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634. [R]

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331. [R]

Lownds, N. F. and J. R. Murgia. 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 17-25. [R]

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441-470. [R]

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Ann. Rev. Genet.* 36: 617-656. [R]

Pardee, A. B. 1989. $G_1$ events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608. [R]

Paulovich, A. G., D. P. Tocyski and L. H. Hartwell. 1997. When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399-402. [R]

Tye, B. K. 1999. MCM proteins in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 649-686. [R]

Vousden, K. H. 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 47-59. [R]

Zhou, B.-B. S. and S. J. Elledge. 2000. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439. [R]

### *Reguladores de la progresión del ciclo celular*

Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15: 2177-2196. [R]

Beach, D., B. Durkacz and P. Nurse. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300: 706-709. [P]

Dynlacht, B. D. 1997. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 389: 149-152. [R]

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396. [P]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267-287. [P]

King, R. W., R. J. Deshaies, J.-M. Peters and M. W. Kirschner. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274: 1652-1659. [R]

Koepp, D. M., J. W. Harper and S. J. Elledge. 1999. How the cyclin became a cyclin: Regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97: 431-434. [R]

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3009-3013. [P]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129-146 [P]

Millband, D. N., L. Campbell and K. G. Hardwick. 2002. The awesome power of multiple model systems: Interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol.* 12: 205-209. [R]

Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81: 149-152. [R]

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Ann. Rev. Genet.* 36: 617-656. [R]

Roberts, J. M. 1999. Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98: 129-132. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399-402. [R]

Sagata, N. 2002. Untangling checkpoints. *Science* 298: 1905-1907. [R]

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677. [R]

Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of $G_1$-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512. [R]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232-247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861-870. [P]

Vousden, K. H. 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 47-59. [R]

Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330. [R]

### *Sucesos de la fase S*

Earnshaw, W. C. and A. F. Pluta. 1994. Mitosis. *BioEssays* 16: 639-643. [R]

Finger, F. P. and J. G. White. 2002. Fusion and fission: Membrane trafficking in animal cytokinesis. *Cell* 108: 727-730. [R]

Glotzer, M. 2001. Animal cell cytokinesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 351-386. [R]

Hirano, T. 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16: 399-414. [R]

King, R. W., P. K. Jackson and M. W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571. [R]

McIntosh, J. R., E. L. Grishchuk and R. R. West. 2002. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 193-219. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81: 149-152. [R]

Nasmyth, K. 2002. Segregating sister ge nomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* 297: 559-565. [R]

Peters, J.-M. 2002. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9: 931-943. [R]

Rieder, C. L. and E. D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8: 310-318. [R]

Shorter, J. and G. Warren. 2002. Golgi architecture and inheritance. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 379-420. [R]

Staehelin, L. A. and P. K. Hepler. 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 84: 821-824. [R]

Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky and C. D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97: 99-109. [P]

### *Meiosis y fecundación*

Champion, M. D. and R. S. Hawley. 2002. Playing for half the deck: The molecular biology of meiosis. *Nature Cell Biol.* 4: S50-S56. [R]

Evans, J. P. and H. M. Florman. 2002. The state of the union: The cell biology of fertilization. *Nature Cell Biol.* 4: S57-S63. [R]

Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology*, 7th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates. Petronczki, M., M. F. Siomos and K. Nasmyth. 2003. Un mE9nage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440. [R]

Roeder, G. S. 1997. Meiotic chromosomes: It takes two to tango. *Genes Devel.* 11: 2600-2621. [R]

Sagata, N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6: 22-28. [R]

Tunquist, B. J. and J. L. Maller. 2003. Under arrest: Cytostatic factor (CSF)-mediated meta phase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17: 683-710. [R]

Villeneuve, A. M. and K. J. Hillers. 2001. Whence meiosis? *Cell* 106: 647-650. [R]

Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183. [R]

### *Células madre y mantenimiento de los tejidos adultos*

Metcalf, D. 1992. Hemopoietic regulators. *Trends Biochem. Sci.* 17: 286-289. [R]

Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances. 1997. Liver regeneration. *Science* 276: 60-66. [R]

Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88: 287-298. [R]

Orkin, S. H. and S. J. Morrison. 2002. Stem-cell competition. *Nature* 418: 25-27. [R]

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13726-13731. [P]

Thompson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknotz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147. [P]

Wilmut, I., N. Beaujean, P. A. de Sousa, A. Dinnyes, T. J. King, L. A. Paterson, D. N. Wells and L. E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586. [R]

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813. [P]

# 15 Cáncer



EL CÁNCER ES UN TEMA APROPIADO para el último Capítulo de este libro, ya que se debe a la alteración de los mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de la célula normal. Como ya se trató en Capítulos anteriores, la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células individuales en los organismos pluricelulares se regulan cuidadosamente para atender los requerimientos del organismo como un todo. Esta regulación no existe en las células cancerosas, que crecen y se dividen de una manera incontrolada, y que en última instancia se propagan por todo el cuerpo e interfieren con la función de los tejidos y de los órganos sanos.

Puesto que el cáncer se debe a alteraciones en los mecanismos fundamentales de la regulación celular, es una enfermedad que en último término ha de ser caracterizada a los niveles molecular y celular. En efecto, la comprensión del cáncer ha sido un objetivo de los biólogos moleculares y celulares durante muchos años. De igual forma, el estudio de las células cancerosas también ha ayudado a esclarecer los mecanismos que regulan el comportamiento de las células sanas. De hecho, muchas de las proteínas que desempeñan papeles clave en la señalización celular en la regulación del ciclo celular, y en el control de la muerte celular programada se identificaron por primera vez porque alteraciones en su actividad causaban la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Por lo tanto, el estudio del cáncer ha contribuido de manera significativa a nuestro conocimiento de la regulación de las células sanas y viceversa.

## Desarrollo y causas del cáncer

La principal alteración que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua e incontrolada de las células cancerosas. En vez de responder apropiadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada, invadiendo los tejidos y los órganos sanos y, finalmente, diseminándose por todo el cuerpo. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células cancerosas es el resultado neto de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula, y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de sus equivalentes sanas.

### *Tipos de cáncer*

El cáncer se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de cien tipos distintos

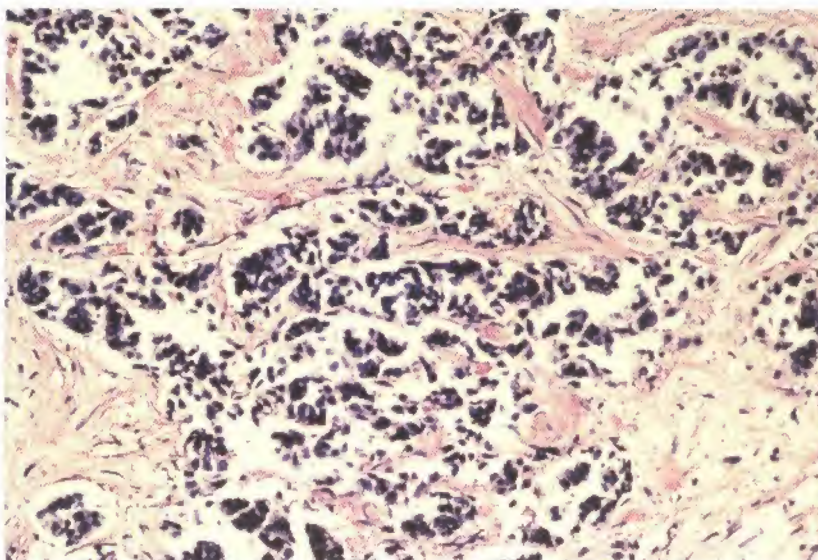


*Figura 15.1*
**Cáncer del páncreas.** Micrografía de luz de una sección a través del páncreas en la que se observa un cáncer pancreático. Las células cancerosas poseen núcleos de color violeta, y están invadiendo el tejido normal (rosa). (Astrid y Hanns-Frieder Michler/SPL/Photo Researchers, Inc.)

de cáncer que pueden diferir sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento. La cuestión más importante en la patología del cáncer es distinguir entre tumores benignos y malignos (Fig. 15.1). Un **tumor** es una proliferación anormal de las células, que puede ser benigno o maligno. Un **tumor benigno**, como las verrugas comunes de la piel, permanece confinado en su localización original, sin invadir el tejido sano adyacente ni propagarse a lugares distantes del cuerpo. Sin embargo, un **tumor maligno** es capaz de invadir el tejido normal adyacente y de propagarse por el cuerpo mediante los sistemas circulatorio o linfático (**metástasis**). Sólo a los tumores malignos se les denomina propiamente como cánceres, y es su capacidad para invadir y dar lugar a la metástasis lo que convierte al cáncer en algo tan peligroso. Mientras que los tumores benignos pueden eliminarse mediante cirugía, la difusión de los tumores malignos a lugares del cuerpo distantes los suele hacer resistentes a este tratamiento local.

Tanto los tumores malignos como los benignos se clasifican de acuerdo al tipo de célula del que proceden. La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de tres tipos principales: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfomas. Los **carcinomas**, que incluyen aproximadamente al 90 % de los cánceres humanos, son alteraciones de las células epiteliales. Los **sarcomas**, que son raros

**TABLA 15.1.** Cánceres más frecuentes

| Localización del cáncer | Casos por año | Muertes por año |
|---|---|---|
| Próstata | 220.900 (16,6 %) | 28.900 (5,2 %) |
| Mama | 212.600 (15,9 %) | 40.200 (7,2 %) |
| Pulmón | 171.900 (12,9 %) | 157.200 (28,2 %) |
| Colon/recto | 147.500 (11,1 %) | 57.100 (10,3 %) |
| Linfomas | 61.000 (4,6 %) | 24.700 (4,4 %) |
| Vejiga | 57.400 (4,3 %) | 12.500 (2,2 %) |
| Piel (melanoma) | 54.200 (4,1 %) | 7.600 (1,4 %) |
| Útero | 52.300 (3,9 %) | 10.900 (2,0 %) |
| Riñón | 31.900 (2,4 %) | 11.900 (2,1 %) |
| Páncreas | 30.700 (2,3 %) | 30.000 (5,4 %) |
| Leucemias | 30.600 (2,3 %) | 21.900 (3,9 %) |
| Subtotal | 1.071.000 (80,3 %) | 402.900 (72,4 %) |
| Todos los sitios | 1.334.100 (100 %) | 556.500 (100 %) |

Fuente: American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures-2003.*

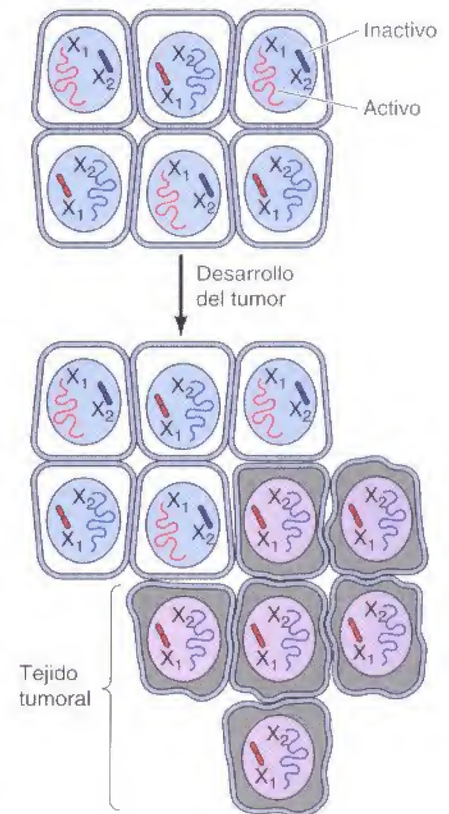



*Figura 15.2*
**Carácter clónico de los tumores.** Un tejido normal es un mosaico de células en las que uno de los cromosomas X diferentes ($X_1$ y $X_2$) se ha inactivado. Los tumores se desarrollan a partir de una única célula inicial alterada, por lo que cada célula tumoral mostrará el mismo patrón de inactivación de X ($X_1$ inactivo, $X_2$ activo).

en humanos, son tumores sólidos de tejidos conectivos, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso. Las **leucemias** y los **linfomas**, que contabilizan aproximadamente el 7% de los casos en humanos, surgen a partir de las células hematopoyéticas y de las células del sistema inmune, respectivamente. Estos tumores se clasifican a su vez atendiendo al tejido de origen (p. ej., carcinoma de pulmón o de mama) y al tipo de célula involucrada. Por ejemplo, los fibrosarcomas surgen a partir de los fibroblastos, y las leucemias eritroides a partir de los precursores de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos).

Aunque hay muchos tipos de cáncer, sólo son mayoritarios unos pocos (Tabla 15.1). En Estados Unidos se diagnostican anualmente más de un millón de casos de cáncer, y más de 500.000 americanos mueren de cáncer al año. Más del 80 % de la incidencia total del cáncer se debe a los que afectan a once zonas distintas del cuerpo. Los cánceres más comunes, que constituyen más de la mitad de los casos de cáncer, son los de mama, próstata, pulmón y colon/recto. El cáncer de pulmón, con mucho el más letal, es el responsable de cerca del 30 % de todas las muertes por cáncer.

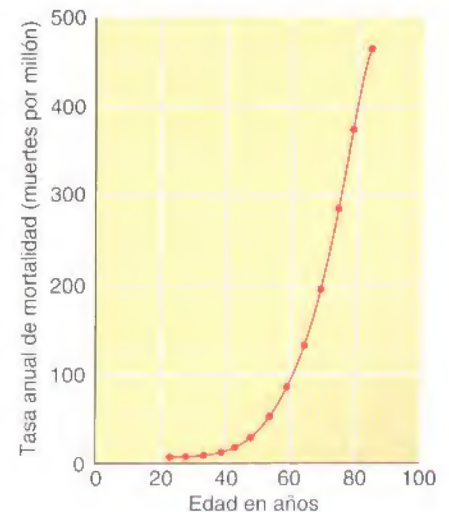
## *Desarrollo del cáncer*

Una de las características fundamentales del cáncer es que los tumores son clones, es decir, los tumores se desarrollan a partir de una única célula que prolifera de manera anormal. El origen de muchos tumores a partir de una única célula se ha demostrado mediante el análisis de la inactivación del cromosoma X (Fig. 15.2). Como ya se trató en el Capítulo 8, un miembro del par de cromosomas X se inactiva en las células femeninas y pasa al estado de heterocromatina. La inactivación del cromosoma X ocurre al azar durante el desarrollo embrionario, por lo que uno de los cromosomas X es inactivado en algunas células mientras que en otras se inactiva el otro cromosoma X. Por lo tanto, si una hembra es heterocigota para un gen del cromosoma X, se expresarán alelos distintos en células distintas. Los tejidos sanos se componen de una mezcla de células con cromosomas X inactivos diferentes, por lo que en los tejidos normales de hembras heterocigotas se detecta la expresión de ambos alelos. Por el contrario, en los tejidos tumorales se suele expresar sólo un alelo de un gen heterocigoto portado por el cromosoma X. Esto implica que todas las células que constituyen ese tumor derivan de una única célula original, en la que se fijó el patrón de inactivación del cromosoma X antes de que el tumor se desarrollara.

Sin embargo, el origen clonal de los tumores no implica que la célula progenitora original que da lugar al tumor tenga, en principio, todas las características de una célula cancerosa. Por el contrario, el desarrollo del cáncer es un proceso «multietapa», en el que las células se convierten en malignas progresivamente a través de una serie de alteraciones. Un dato que indica el desarrollo multietapa del cáncer es que la mayoría de los cánceres se desarrollan en las etapas tardías de la vida. Por ejemplo, la incidencia del cáncer de colon se incrementa por un factor de más de diez entre los 30 y 50 años de edad, y por otro factor de diez, entre los 50 y 70 años (Fig. 15.3). Este incremento tan drástico de la incidencia del cáncer con la edad sugiere que la mayoría de los cánceres se desarrollan como consecuencia de múltiples alteraciones, que se acumulan durante muchos años.

A nivel celular, el desarrollo del cáncer se considera un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de aquellas células con una capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Fig. 15.4). El primer paso del proceso, la **iniciación del tumor**, se considera que se

*Figura 15.3*
**Incremento de la tasa de cáncer de colon con la edad.** Tasa de muertes anuales por cáncer de colon en los Estados Unidos. (Datos a partir de J. Cairns, 1978. *Cancer: Science and Society*, New York: W.H. Freeman.)



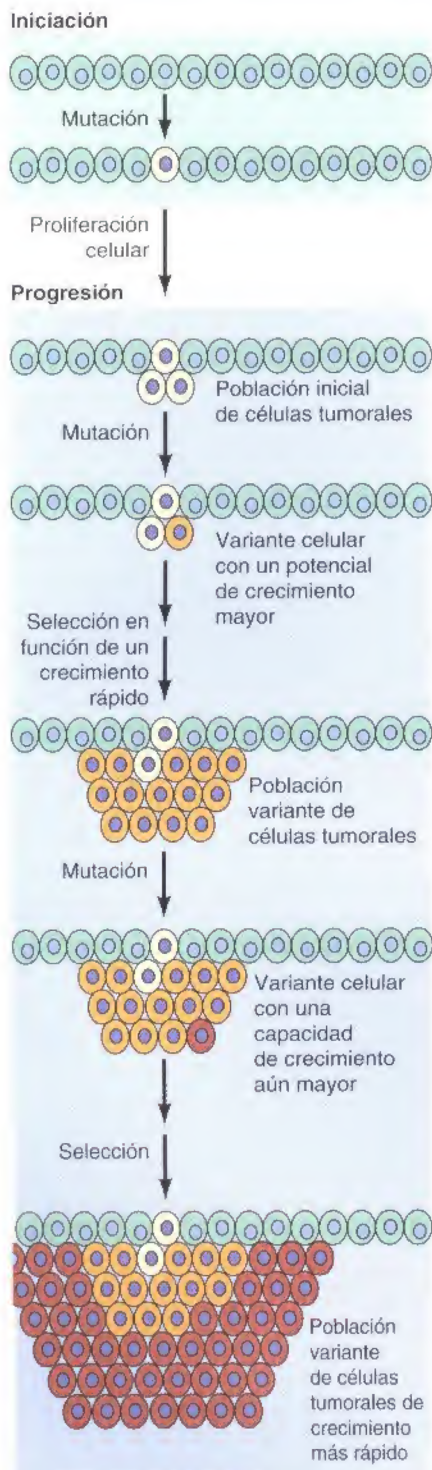



*Figura 15.4*
**Etapas del desarrollo de un tumor.** El desarrollo de un cáncer se inicia cuando una única célula que ha sufrido una mutación comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales, a las que les sigue una selección de aquellas células de la población en función de su ritmo de crecimiento, dan lugar a la progresión del tumor caracterizado por un crecimiento más rápido y una mayor malignidad.

debe a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una única célula. La proliferación celular da lugar a una población clonal de células tumorales. La **progresión del tumor** se produce a medida que se producen mutaciones adicionales en las células de la población del tumor. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, como por ejemplo, un crecimiento más rápido, y los descendientes de las células que portan dicha mutación dominarán en la población tumoral. Este proceso se denomina selección clonal, puesto que un nuevo clon de células tumorales ha evolucionado en función de su ritmo de crecimiento más rápido o de otras propiedades (como la supervivencia, invasión o metástasis) que le confieren una ventaja selectiva. La selección clonal continúa durante el desarrollo del tumor, por lo que los tumores cada vez crecen más deprisa y aumenta cada vez más su carácter maligno.

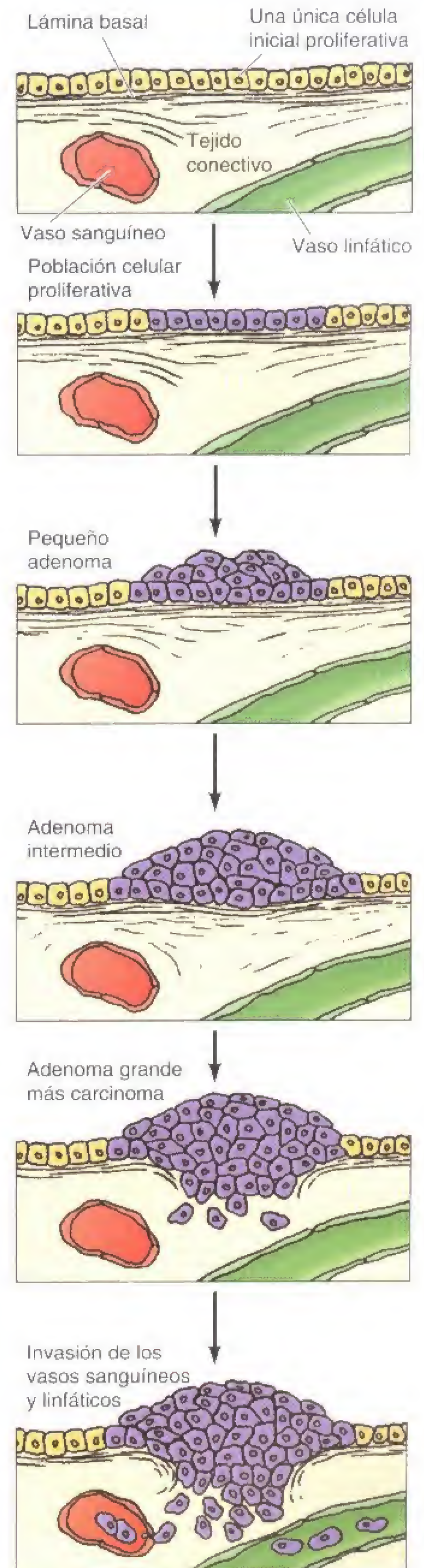
Los estudios de los carcinomas de colon proporcionan un claro ejemplo de la progresión tumoral durante el desarrollo de una alteración maligna humana común (Fig. 15.5). El primer estadio en el desarrollo del tumor es el aumento de la proliferación de las células epiteliales de colon. Una de las células de esta población en crecimiento dará lugar a una pequeña neoplasia benigna (un **adenoma** o **pólipo**). Posteriores rondas de selección clonal dan lugar al crecimiento de adenomas de un tamaño y potencial proliferativo cada vez mayor. Entonces surgen carcinomas malignos a partir de los adenomas benignos, lo cual se reconoce por la invasión de las células tumorales a través de la lámina basal hasta el tejido conectivo subyacente. A partir de aquí, las células cancerosas continúan proliferando y se propagan a través de los tejidos conectivos de la pared del colon. Finalmente las células cancerosas atraviesan la pared del colon e invaden otros órganos abdominales, como la vejiga o el intestino delgado. Además, las células cancerosas invaden los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les permite formar metástasis por todo el cuerpo.

## Causas del cáncer

Las sustancias que causan cáncer, denominadas **carcinógenos**, se han identificado mediante estudios en animales de experimentación y mediante análisis epidemiológicos de la frecuencia del cáncer en las poblaciones humanas (p. ej., la elevada incidencia de cáncer de pulmón entre los fumadores). Puesto que el desarrollo del carácter maligno es un proceso multietapa complejo, son muchos los factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer y, en la mayoría de los cánceres, es simplista hablar de una única causa. De todas maneras, se han encontrado muchos agentes, entre los que se incluyen la radiación, productos químicos y virus, que inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en humanos.

La radiación y muchos carcinógenos químicos (Fig. 15.6) actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. A estos carcinógenos se les suele denominar agentes iniciadores, puesto que la inducción de mutaciones en determinados genes se considera el proceso inicial que conduce al desarrollo del cáncer. Alguno de los agentes iniciadores que contribuyen a causar cánceres humanos son la radiación ultravioleta del sol (la principal causa de cáncer de piel), los productos químicos carcinógenos en el humo del tabaco, y la aflatoxina (un potente carcinógeno hepático producido por algunos mohos que contaminan reservas de cacahuetes y de otros tipos de grano almacenadas de forma inadecuada). Los carcinógenos en el humo del tabaco (incluyendo el benzo(*a*)pireno, la dimetilnitrosamina, y los compuestos de níquel) son las principales causas identificadas de cáncer en el hombre. Fumar es la causa indiscutible del 80 % al 90 %

*Figura 15.5*
**Desarrollo de carcinomas de colon.** Una única célula alterada da lugar a una población celular proliferativa, que primero evoluciona a adenomas benignos de un tamaño cada vez mayor, y posteriormente a un carcinoma maligno. Las células cancerosas invaden el tejido conectivo subyacente y penetran en los vasos sanguíneos y linfáticos, distribuyéndose de esta manera por todo el cuerpo.



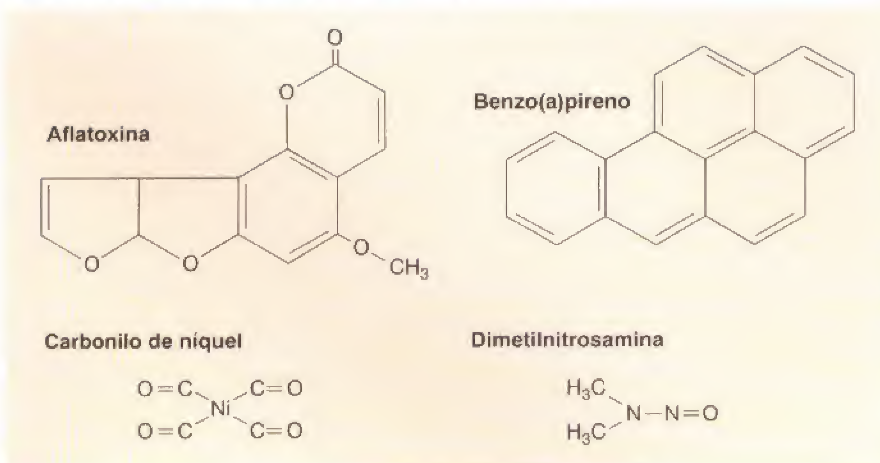

de los cánceres de pulmón, e igualmente está implicado en los cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe, esófago y otras partes. En total, se estima que fumar es la causa de casi un tercio de todas las muertes por cáncer —una mortalidad impresionante para un único agente carcinógeno—.

Otros carcinógenos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular, en vez de induciendo mutaciones. Estos compuestos se denominan **promotores tumorales**, puesto que el incremento de la división celular que inducen se requiere para el desarrollo de una población celular proliferativa durante los primeros estadios del desarrollo del tumor. Un ejemplo clásico son los ésteres de forbol que estimulan la proliferación celular activando la proteína quinasa C (véase Fig. 13.26). Su actividad se caracterizó a través de los estudios de inducción química de tumores de piel en ratones (Fig. 15.7). En este sistema la génesis del tumor puede iniciarse mediante un único tratamiento con un carcinógeno mutagénico. Sin embargo, los tumores no se desarrollan a no ser que los ratones sean tratados con un promotor tumoral (normalmente un éster de forbol) que estimule la proliferación de las células mutadas.

Las hormonas, principalmente los estrógenos, son promotores tumorales importantes en el desarrollo de algunos cánceres humanos. Por ejemplo, la proliferación de las células del endometrio uterino es estimulada por los estrógenos, y la exposición a un exceso de estrógenos incrementa de manera significativa la posibilidad de que una mujer acabe desarrollando un cáncer de endometrio. Por lo tanto, la terapia basada en altas dosis de estrógenos durante largo tiempo para tratar la menopausia incrementa el riesgo de cáncer de endometrio. Afortunadamente este riesgo disminuye administrando progesterona para contrarrestar el efecto estimulador de los estrógenos en la proliferación celular en el endometrio. Sin embargo, la terapia durante largo tiempo basada en la combinación de estrógenos y progesterona puede incrementar el riesgo de cáncer de mama.

Además de la radiación y de los productos químicos, algunos virus inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en humanos. Los cánceres humanos comunes causados por virus incluyen al cáncer de hígado y al carcinoma cervical, que en conjunto suponen del 10 al 20 % de la incidencia mundial

*Figura 15.6*
**Estructura de carcinógenos químicos representativos.**



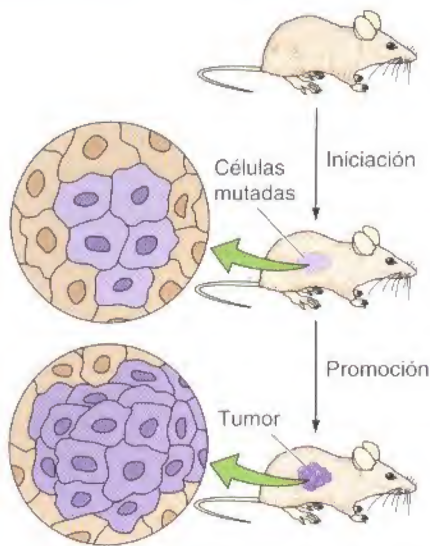



*Figura 15.7*
**Inducción de tumores en la piel del ratón.** Los tumores se inician por mutaciones inducidas por un carcinógeno. Entonces, para que el tumor se desarrolle, se requiere el tratamiento con un promotor tumoral que estimule la proliferación de las células mutadas.

del cáncer. Estos virus no son solamente importantes como causas de cáncer en el hombre; como se tratará posteriormente en este Capítulo, los estudios acerca de los virus tumorales han desempeñado un papel fundamental en la caracterización de los procesos moleculares responsables del desarrollo de los cánceres inducidos por carcinógenos víricos y no víricos.

## *Propiedades de las células cancerosas*

El crecimiento incontrolado de las células cancerosas se debe a la acumulación de alteraciones que afectan a muchos de los mecanismos de la regulación celular que se han visto en los Capítulos anteriores. Esta relación se observa en muchos de los aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de las células normales. Las células cancerosas manifiestan alteraciones en los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular normal. En conjunto, estas propiedades características de las células cancerosas permiten una descripción a nivel celular del carácter maligno.

Las células en cultivo simulan la proliferación incontrolada de las células cancerosas *in vivo*. Una primera diferencia entre las células cancerosas y las células normales en cultivo es que las células normales muestran una **inhibición de la proliferación dependiente de la densidad** (Fig. 15.8). Las células normales proliferan hasta alcanzar una densidad celular determinada, en función de la disponibilidad de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo (normalmente en forma de suero). Entonces cesa su proliferación y permanecen en reposo, detenidas en la fase $G_0$ del ciclo celular (véase Fig. 14.6). Sin embargo, la proliferación de la mayoría de las células cancerosas no es sensible a esta inhibición dependiente de la densidad. En vez de responder a las señales que hacen que las células normales dejen de proliferar y entren en $G_0$, las células tumorales siguen creciendo hasta alcanzar una densidad elevada de células en cultivo, de la misma manera que ocurre con la proliferación incontrolada *in vivo*.

Una diferencia entre las células normales y las células cancerosas relacionada con lo anterior es que muchas células cancerosas requieren pocos factores de crecimiento extracelulares. Como ya se trató en el Capítulo 13, la proliferación de la mayoría de las células se controla, al menos en parte, por factores de crecimiento polipeptídicos. Para algunos tipos celulares, especialmente los fibroblastos, la disponibilidad de los factores de crecimiento séricos es el principal determinante de su capacidad de crecimiento en cultivo. El requerimiento por parte de estas células de los factores de crecimiento está muy relacionado con el fenómeno de la inhibición dependiente de la densidad, puesto que la densidad a la que los fibroblastos normales entran en reposo es proporcional a la concentración de los factores de crecimiento séricos en el medio de cultivo.




*Figura 15.8*
**Inhibición dependiente de la densidad.** Las células normales proliferan en cultivo hasta que se alcanza una determinada densidad celular; a partir de entonces las células permanecen en reposo. Sin embargo, las células tumorales siguen proliferando con independencia de la densidad celular alcanzada.

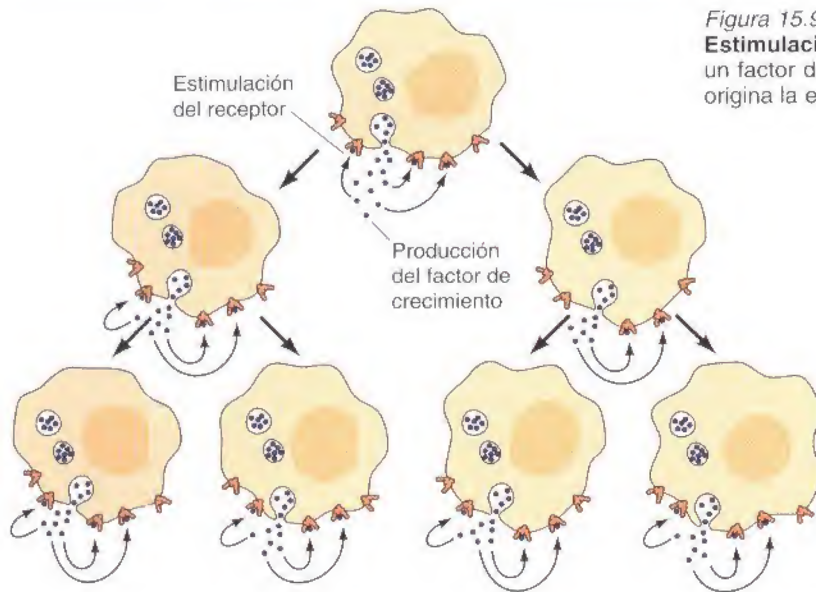


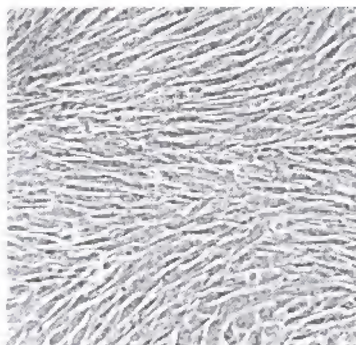

*Figura 15.9*
**Estimulación autocrina del crecimiento.** Una célula produce un factor de crecimiento frente al cual también responde, lo que origina la estimulación continua de la proliferación celular.

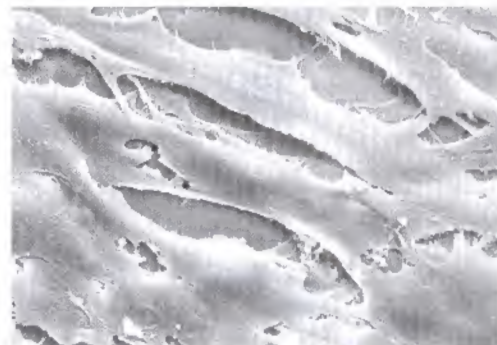
En el caso de muchas células tumorales su necesidad de factores de crecimiento es mucho menor comparada con la de las células normales, lo que contribuye a la proliferación incontrolada de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. En algunos casos, las células cancerosas producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación (Fig. 15.9). Esta producción anormal de un factor de crecimiento por parte de la célula conduce a la autoestimulación continua de la división celular (**estimulación autocrina del crecimiento**), por lo que las células cancerosas dependen en menor medida de los factores de crecimiento que provengan de otras fuentes fisiológicas normales. En otras ocasiones, las células cancerosas tienen un requerimiento reducido de factores de crecimiento debido a que los sistemas de señalización intracelular están alterados; es decir, no está regulada la actividad de los receptores de los factores de crecimiento o la de otras proteínas (p. ej., proteínas Ras o proteína quinasas) que se trataron en el Capítulo 13 como componentes de las vías de transducción de las señales que conducen a la proliferación celular.

La regulación de las células cancerosas mediante las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, también se produce de una manera menos rigurosa que en el caso de las células normales. La mayoría de las células cancerosas tiene menos capacidad de adhesión que las células normales, lo que es debido, generalmente, a una expresión reducida de las moléculas de adhesión de la superficie celular. Por ejemplo, la pérdida de la E-cadherina, la molécula de adhesión principal de las células epiteliales, es un factor importante para el desarrollo de carcinomas (cánceres epiteliales). Debido a que las moléculas de adhesión celular tienen un bajo nivel de expresión, las células cancerosas están poco restringidas por las interacciones con otras células y con otros componentes tisulares, lo que proporciona a las células malignas la capacidad de invadir y dar lugar a metástasis. La poca adhesividad de las células cancerosas también da lugar a alteraciones morfológicas y del citoesqueleto: muchas células tumorales son más redondeadas que las normales, en parte debido a que no se unen de una manera tan firme ni a la matriz extracelular ni a las células vecinas.

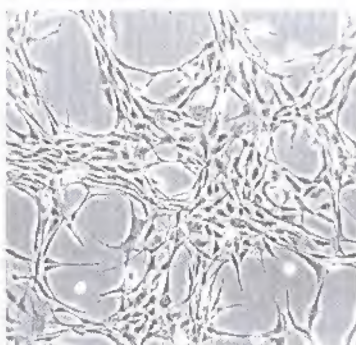
Una diferencia llamativa en las interacciones célula-célula entre las células normales y las células cancerosas se muestra en el fenómeno de la **inhibición por contacto** (Fig. 15.10). Los fibroblastos normales migran a través de la superficie de la placa de cultivo hasta que contactan con la célula vecina. Entonces se inhibe la migración celular, y las células normales se adhieren unas a otras formando una estructura ordenada en la superficie de la placa de cultivo. Sin embargo, las células tumorales siguen desplazándose tras el contacto con

Células normales





Células tumorales



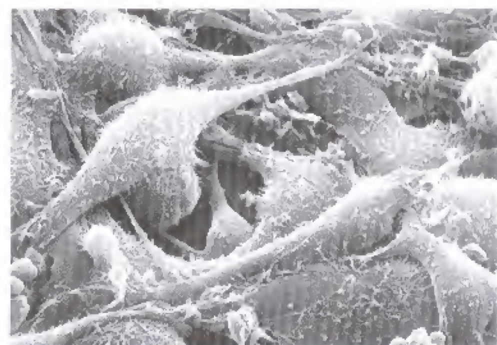


*Figura 15.10*
**Inhibición por contacto.** Micrografías al microscopio óptico (izquierda) y al microscopio electrónico de barrido (derecha), de fibroblastos normales y de células tumorales. La migración de los fibroblastos normales se inhibe mediante el contacto celular, por lo que se disponen ordenadamente, lado junto a lado, en la superficie de la placa de cultivo. Sin embargo, las células tumorales no se inhiben por contacto celular, por lo que migran unas sobre otras y se disponen de una manera desordenada formando una estructura en varias capas. (Cortesía de Lan Bo Chen, Dana-Farber Cancer Institute.)

sus vecinas, migrando a través de las células adyacentes dando lugar a un patrón en varias capas y desorganizado. No solamente el movimiento, sino también la proliferación de muchas células normales se inhibe por contacto célula-célula, y las células cancerosas son, de una manera característica, insensibles a esta inhibición por contacto del crecimiento.

Otras dos propiedades de las células cancerosas afectan a su integración con otros componentes tisulares, por lo que desempeñan un papel importante en la invasión y en la metástasis. En primer lugar, las células transformadas suelen secretar proteasas que digieren los componentes de la matriz extracelular, lo que permite a las células cancerosas invadir los tejidos normales adyacentes. Por ejemplo, la secreción de colagenasa parece ser un factor importante en la capacidad de los carcinomas de digerir y penetrar a través de la lámina basal invadiendo el tejido conectivo subyacente (véase Fig. 15.5). En segundo lugar, las células cancerosas secretan factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (**angiogénesis**). La angiogénesis es necesaria para mantener el crecimiento de un tumor por encima de un tamaño de un millón de células, punto en el que se requieren nuevos vasos sanguíneos para proporcionar oxígeno y nutrientes a las células tumorales en proliferación. Estos vasos sanguíneos se forman en respuesta a factores de crecimiento secretados por las células tumorales; estos estimulan la proliferación de las células endoteliales de las paredes de los capilares en el tejido contiguo, lo que origina la extensión de nuevos capilares en el tumor. La formación de estos nuevos vasos sanguíneos es importante no sólo para mantener el crecimiento del tumor, sino también en la metástasis. Las células tumorales pueden penetrar fácilmente en los nuevos capilares formados en respuesta a la estimulación angiogénica, lo que proporciona una nueva oportunidad para que las células cancerosas entren en el sistema circulatorio y comience el proceso de metástasis.

Otra característica general de la mayoría de las células cancerosas es que no se diferencian de manera normal. Esta diferenciación defectuosa se asocia a la proliferación anormal, puesto que, como ya se discutió en el Capítulo 14, la mayoría de las células diferenciadas o se dividen con muy poca frecuencia o no

se dividen. Las células cancerosas en vez de llevar a cabo su programa de diferenciación normal, se bloquean en un estado temprano de diferenciación, lo que concuerda con su proliferación activa continua.

Las leucemias proporcionan un ejemplo particularmente bueno de la relación entre una diferenciación defectuosa y la característica de malignidad de estas células. Todos los tipos diferentes de células sanguíneas se derivan de una célula madre común de la médula ósea (véase Fig. 14.44). Los descendientes de estas células están determinados a seguir vías de diferenciación específicas. Por ejemplo, algunas células se diferencian para formar eritrocitos mientras que otras se diferencian para formar linfocitos, granulocitos, o macrófagos. Las células de cada uno de estos tipos sufren varias rondas de división a medida que se diferencian, pero una vez que se han diferenciado por completo, cesa la división celular. Por el contrario, las células leucémicas son incapaces de sufrir la diferenciación terminal (Fig. 15.11). En vez de ello, se detienen en los estadios tempranos de maduración manteniendo su capacidad de proliferación y siguen reproduciéndose.

Como ya se trató en el Capítulo 13, la **muerte celular programada** o **apoptosis** es un componente del programa de diferenciación de muchos tipos celulares, incluyendo las células sanguíneas. Muchas células cancerosas no sufren apoptosis, por lo que tienen ciclos vitales más largos en comparación con las células normales. Esta incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada contribuye de una manera sustancial al desarrollo del tumor. Por ejemplo, la supervivencia de muchas células normales depende de las señales generadas por factores de crecimiento o por la matriz extracelular, que evitan la apoptosis. Sin embargo, las células tumorales pueden ser capaces de sobrevivir en ausencia de estos factores de crecimiento requeridos por las células normales. Esta incapacidad de las células tumorales de sufrir apoptosis cuando se les priva de las señales ambientales normales puede ser importante no solamente para el desarrollo del tumor primario, sino también para la supervivencia y el crecimiento de las células metastásicas en otros tejidos. Las células normales también sufren apoptosis tras la lesión del ADN, mientras que esto no les sucede a las células cancerosas. En este caso, la incapacidad de sufrir apoptosis contribuye a que las células cancerosas sean resistentes a la radiación y a muchas drogas quimioterapéuticas, que actúan da-

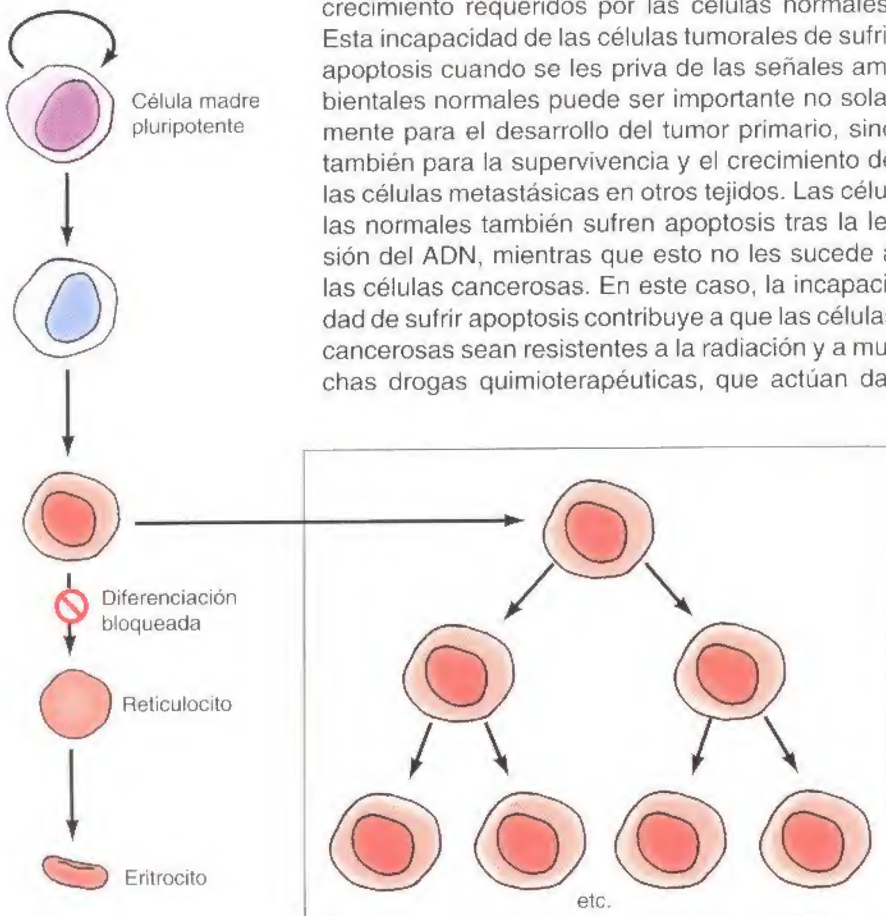



*Figura 15.11*
**Diferenciación defectuosa y leucemia.** Los diferentes tipos de células sanguíneas se desarrollan a partir de una célula madre multipotencial (pluripotente) en la médula ósea. Los precursores de las células diferenciadas sufren varias rondas de división celular a medida que maduran, pero cesan de dividirse en los estadios terminales de la diferenciación. La diferenciación de las células leucémicas se bloquea en los estadios iniciales de maduración, lo que permite que continúen proliferando.

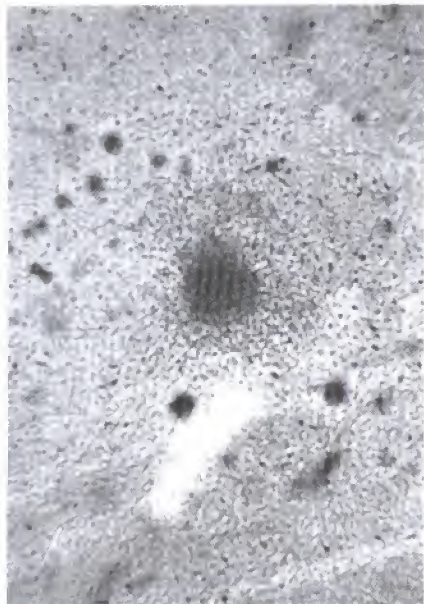


*Figura 15.12*
**Ensayo focal.** Un foco de fibroblastos de embrión de pollo inducido por el virus del sarcoma de Rous. (A partir de H.M. Temin y H. Rubin, 1958. *Virology* 6: 669.)

ñando el ADN. Además de evitar la apoptosis, las células cancerosas generalmente adquieren la capacidad de replicación ilimitada como resultado de la expresión de la telomerasa, que es necesaria para el mantenimiento los extremos de los cromosomas eucarióticos (véase Fig. 5.17). Por lo tanto, la supervivencia celular anormal así como la proliferación celular, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento inexorable de las células cancerosas en el animal.

### *Transformación de las células en cultivo*

Para poder estudiar la inducción de tumores por radiación, agentes químicos o virus se requieren sistemas experimentales en los que se puedan reproducir y cuantificar los efectos del agente carcinógeno. Aunque la actividad de los carcinógenos se pueda probar en los animales, estos experimentos son difíciles de cuantificar y de controlar. El desarrollo de los ensayos *in vitro* para detectar la conversión de las células normales en células tumorales en cultivo, un proceso denominado **transformación celular**, representó un avance fundamental en la investigación del cáncer. Estos ensayos se diseñan para detectar células transformadas, que muestran las características de crecimiento *in vitro* de las células tumorales, tras la exposición de un cultivo de células normales a un agente carcinógeno. Su aplicación ha permitido alcanzar un nivel de complejidad tal en el análisis de la transformación celular que no se hubiera alcanzado simplemente mediante los estudios en animales.

El primer ensayo de transformación celular y el más ampliamente utilizado es el ensayo focal, que lo desarrollaron Howard Temin y Harry Rubin en 1958. El ensayo focal se basa en la capacidad de reconocer un grupo de células transformadas como un «foco» diferenciado morfológicamente frente a un fondo de células normales en la superficie de una placa de cultivo (Fig. 15.12). El ensayo focal aprovecha tres propiedades de las células transformadas: la morfología alterada, la pérdida de la inhibición por contacto y la pérdida de la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad. El resultado es que se forma una colonia de células transformadas, morfológicamente alteradas, que crecen por encima de un fondo de células normales en el cultivo. Estos focos de células transformadas pueden detectarse y cuantificarse en una semana o dos tras la exposición a un agente carcinógeno. En general, las células transformadas *in vitro* son capaces de generar tumores tras su inoculación en animales, lo que confirma a la transformación *in vitro* como un indicador válido de la formación de células cancerosas.

## Virus tumorales

Los miembros de seis familias diferentes de virus animales, denominados **virus tumorales**, son capaces de causar cáncer directamente tanto en animales de experimentación como en humanos (Tabla 15.2). Los virus que causan cáncer en

**TABLA 15.2.** Virus tumorales

| Familia de virus | Tumores humanos | Tamaño del genoma (kb) |
|---|---|---|
| **Virus de ADN tumorales** | | |
| Virus de la hepatitis B | Cáncer de hígado | 3 |
| SV40 y poliomavirus | Ninguno | 5 |
| Papilomavirus | Carcinoma cervical | 8 |
| Adenovirus | Ninguno | 35 |
| Herpesvirus | Linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, sarcoma de Kaposi | 100-200 |
| **Virus de ARN tumorales** | | |
| Virus de la hepatitis C | Cáncer de hígado | 10 |
| Retrovirus | Leucemia de las células T de adultos | 9-10 |

humanos incluyen los virus de la hepatitis B y C (cáncer hepático), los papilomavirus (cáncer cervical y otros anogenitales), virus de Epstein-Barr (linfoma de Buritt y carcinoma nasofaríngeo), herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (sarcoma de Kaposi) y virus linfotrópico de células T humanas (leucemia de células T adultas). Adicionalmente, el VIH es indirectamente responsable de los cánceres que se desarrollan en pacientes de SIDA como consecuencia de la inmunodeficiencia.

Como ya se comentó, los virus tumorales no sólo son causas importantes de enfermedades humanas sino que también han desempeñado un papel crítico en la investigación del cáncer al servir como modelos para los estudios celulares y moleculares de la transformación celular. El pequeño tamaño de sus genomas ha hecho que los virus tumorales se puedan analizar molecularmente, lo que ha permitido identificar genes virales responsables de la inducción del cáncer, y lo que ha facilitado nuestra comprensión actual del cáncer a nivel molecular.

## *Virus de la hepatitis B y C*

El **virus de la hepatitis B** tiene el genoma más pequeño de todos los virus de ADN de animales (aproximadamente 3 kb), e infecta de manera específica a las células hepáticas de varias especies, entre las que se incluyen patos, marmotas, ardillas y humanos. La infección con el virus de la hepatitis B da lugar a una lesión aguda del hígado. Sin embargo, en el 5 al 10 % de los casos la infección aguda no desaparece y se desarrolla una infección crónica del hígado. Esta infección crónica incrementa por un factor de más de cien el riesgo de contraer cáncer de hígado. La infección por el virus de la hepatitis B es especialmente frecuente en algunas partes de Asia y África, donde se relaciona con más de un millón de casos anuales de cáncer de hígado (aproximadamente el 10 % de la incidencia mundial del cáncer).

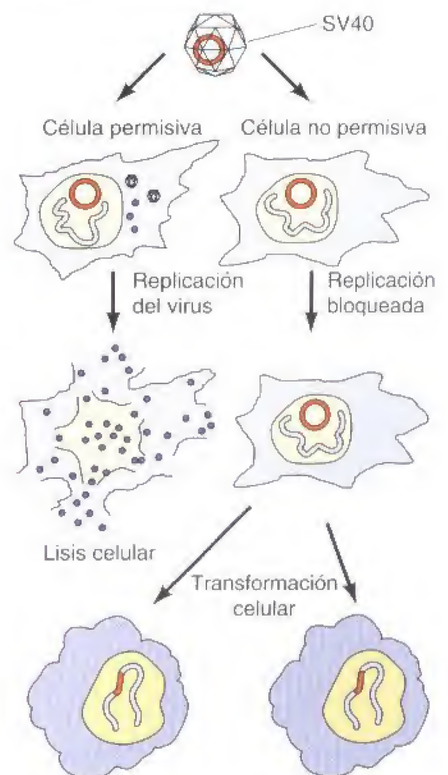
La transformación celular por el virus de la hepatitis B está mediada por un gen vírico (denominado gen *X*) que afecta a la expresión de varios genes celulares, lo que provoca la proliferación y la supervivencia anormal de la célula. Además, los cánceres inducidos por el virus de la hepatitis B se desarrollan debido a la proliferación continua de las células hepáticas, la cual se debe al daño crónico y a la inflamación que sufre el tejido. El **virus de la hepatitis C** es un virus de ARN con un genoma de aproximadamente 10 kb. Al igual que la hepatitis B, el virus de la hepatitis C también puede establecer infecciones hepáticas crónicas que se asocian con un elevado riesgo de cáncer. La proliferación celular en respuesta a la inflamación crónica es un gran contribuyente al desarrollo de cáncer, aunque también es posible que algunas proteínas del virus de la hepatitis C estimulen directamente la proliferación de las células hepáticas infectadas.

## *SV40 y poliomavirus*

Los virus tumorales de ADN mejor estudiados, desde el punto de vista de la biología molecular, probablemente sean el **virus de simio 40 (SV40)** y los **poliomavirus.** Aunque ninguno de estos virus está relacionado con el cáncer en humanos, han resultado fundamentales como modelos para comprender la base molecular de la transformación celular. La utilidad de estos virus en la investigación del cáncer proviene de la disponibilidad de cultivos celulares adecuados tanto para la replicación del virus como para la transformación, así como del pequeño tamaño de sus genomas (aproximadamente 5 kb).

El SV40 y el poliomavirus no inducen tumores ni transforman células en sus especies hospedadoras naturales —monos y ratones respectivamente—. En las células de sus hospedadores naturales (células permisivas), la infección conduce a la replicación del virus, a la lisis celular, y a la liberación de una progenie de partículas del virus (Fig. 15.13). Puesto que una célula permisiva muere debido a la replicación del virus, no puede ser transformada. Sin embargo, el potencial transformante de estos virus se revela en la infección de aquellas células no permisivas en las que se bloquea la replicación del virus. En este caso, el genoma viral puede integrarse en el ADN celular, y la expresión de determinados genes virales provoca la transformación de la célula infectada.

*Figura 15.13*
**Replicación y transformación del virus SV40.** La infección de una célula permisiva da como resultado la replicación del virus, la lisis celular y la liberación de las partículas de la progenie del virus. En las células no permisivas se bloquea la replicación del virus, lo que permite la transformación permanente de algunas células.



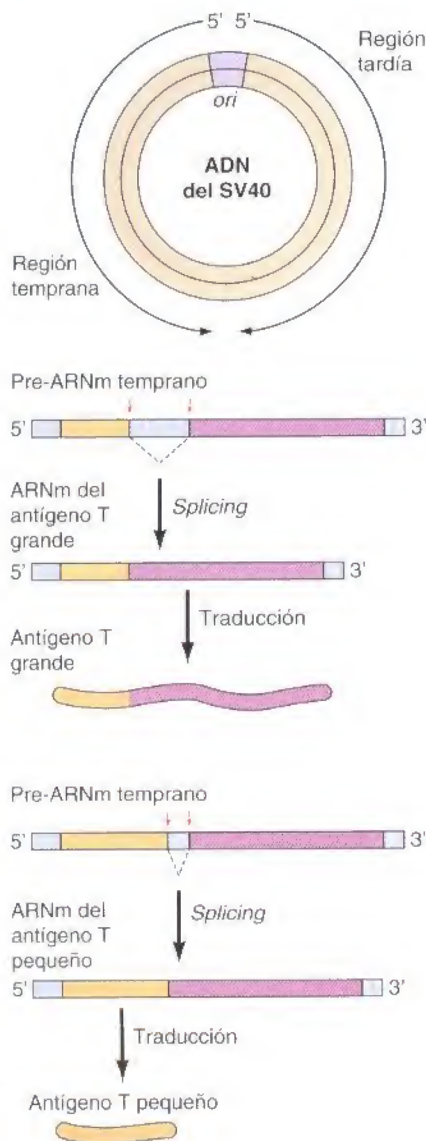



*Figura 15.14*
**Genoma del SV40.** Genoma se estructura en una región temprana y en una región tardía. Los antígenos T grande y pequeño se producen mediante un *splicing* alternativo de un pre-ARNm de la región temprana.

Los genes del SV40 y del poliomavirus que conducen a la transformación celular se han identificado mediante un análisis molecular detallado. Los genomas virales y los ARNm se han secuenciado completamente, se han aislado mutantes víricos que son incapaces de inducir la transformación, y se ha determinado el potencial transformador de los genes virales mediante ensayos de transferencia génica. Así, se ha encontrado que la transformación por estos virus se debe a la expresión de los mismos genes virales que se activan en las etapas tempranas de la infección lítica. Los genomas del SV40 y del poliomavirus se dividen en dos regiones: temprana y tardía. La región temprana se expresa inmediatamente después de la infección y se requiere para la síntesis del ADN del virus. La región tardía no se expresa hasta que haya comenzado la replicación del ADN vírico, e incluye genes que codifican para componentes estructurales de la partícula del virus. La región temprana del SV40 codifica dos proteínas, denominadas antígenos T pequeño y grande, de aproximadamente 17 kDa y 94 kDa, respectivamente (Fig. 15.14). Sus ARNm se generan por *splicing* alternativo de un único tránscrito primario de la región temprana. Igualmente el poliomavirus codifica para antígenos T pequeño y grande, así como para una tercera proteína de la región temprana, de aproximadamente 55 kDa, denominada T mediana. La transfección de las células con ADNc de proteínas individuales de la región temprana muestra que, en el caso del SV40, el antígeno T grande es suficiente para inducir la transformación, mientras que en el caso del poliomavirus el principal responsable de la transformación es el antígeno T mediano.

Durante la infección lítica, estas proteínas de la región temprana llevan a cabo múltiples funciones que se requieren para la replicación del virus. Por ejemplo, el antígeno T del SV40 se une al origen del ADN de SV40 e inicia la replicación del ADN vírico (véase Cap. 5). Además, las proteínas de la región temprana de SV40 y del poliomavirus activan la expresión génica y la síntesis del ADN de la célula huésped. Puesto que la replicación del virus depende de las enzimas de la célula huésped (p. ej., ADN polimerasa), esta activación de la célula huésped es un suceso crítico en el ciclo vital del virus. La mayoría de las células del animal no proliferan, por lo que su división ha de ser activada para producir las enzimas necesarias para la replicación del ADN viral. Esta activación de la proliferación celular por parte de los productos génicos tempranos, puede producir la transformación si el ADN viral se integra de manera estable y se expresa en una célula no permisiva.

Como se tratará posteriormente en este Capítulo, las proteínas de la región temprana del SV40 y del poliomavirus inducen la transformación mediante la interacción con las proteínas del huésped que regulan la proliferación celular. Por ejemplo, el antígeno T de SV40 se une e inactiva a las proteínas supresoras de tumores Rb y p53 de la célula huésped, que son reguladores clave de la proliferación y supervivencia celular.

## *Papilomavirus*

Los papilomavirus son pequeños virus de ADN (genomas de aproximadamente 8 kb) que inducen tumores tanto benignos como malignos en humanos y en otras especies animales. Se han identificado aproximadamente 60 tipos diferentes de papilomavirus humanos, que infectan las células epiteliales de diferentes tejidos. Algunos de estos virus causan únicamente tumores benignos (como las verrugas), mientras que otros son agentes causantes de carcinomas malignos, particularmente cáncer cervical y otros cánceres anogenitales. La mortalidad por cáncer cervical es relativamente baja en los Estados Unidos, debido en gran parte a la detección precoz y al tratamiento que son posibles gracias a la técnica de Papanicolau. Sin embargo, en otras partes del mundo el cáncer cervical es frecuente; es el responsable del 5 al 10 % de la incidencia mundial del cáncer.

La transformación celular por los papilomavirus humanos se debe a la expresión de dos genes tempranos, *E6* y *E7* (Fig. 15.15). Las proteínas E6 y E7 actúan

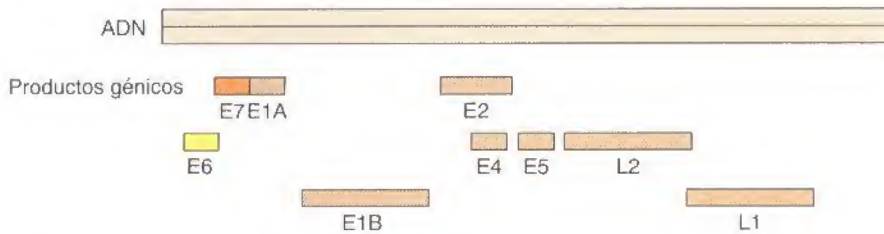



*Figura 15.15*
**Genoma de un papilomavirus humano.** Los productos génicos se designan como E (*early*-tempranos) y L (*late*-tardíos). La transformación se debe a la acción de E6 y de E7.

de manera similar a como lo hace el antígeno T de SV40 interfiriendo con la función de las proteínas celulares Rb y p53. Concretamente, E7 se une a Rb, y E6 activa la degradación de p53 por una proteolisis mediada por ubiquitinas.

## *Adenovirus*

Los adenovirus son una familia grande de virus de ADN con genomas de 35 kb, aproximadamente. A diferencia de los papilomavirus, los adenovirus no están relacionados con la aparición de cánceres ni en humanos ni en otros animales. Sin embargo, son ampliamente estudiados y son modelos importantes en la biología experimental del cáncer.

Al igual que el SV40 y los poliomavirus, los adenovirus causan la lisis en las células de sus especies hospedadoras naturales, pero pueden inducir la transformación en aquellos hospedadores no permisivos. La transformación por los adenovirus se debe a la expresión de dos genes tempranos, *E1A* y *E1B*, que se requieren para la replicación del virus en las células permisivas (Fig. 15.16). Estas proteínas transformadoras inactivan las proteínas supresoras de tumores Rb y p53; E1A se une a Rb y E1B se une a p53. Por lo tanto, parece ser que el SV40, los papilomavirus y los adenovirus inducen la transformación a través de una vía común, alterando la regulación del ciclo celular debido a la interferencia con las actividades de Rb y p53.

## *Herpesvirus*

Los herpesvirus se encuentran entre los virus animales más complejos, con genomas de 100 a 200 kb. Varios herpesvirus inducen tumores en especies animales, entre las que se incluyen ranas, pollos y monos. Además, dos miembros de la familia de los herpesvirus, el **herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi** y el **virus de Epstein-Barr**, se relacionan con cánceres humanos. El herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi desempeña un papel crítico en el desarrollo del sarcoma de Kaposi, y el virus de Epstein-Barr se ha relacionado con varios cánceres humanos, entre los que se incluyen el linfoma de Burkitt en algunas regiones de África, los linfomas de células B en pacientes con sida y otros individuos inmunodeprimidos, y el carcinoma nasofaríngeo en China.

Además de su asociación con estos cánceres humanos, el virus de Epstein-Barr es capaz de transformar linfocitos B humanos en cultivo. Sin embargo, debido en parte a la complejidad de su genoma, la biología molecular de la replicación y de la transformación del virus de Epstein-Barr todavía no se ha comprendido en su totalidad. Varios genes víricos parecen ser necesarios para inducir la transformación de los linfocitos. Una de estas proteínas transformadoras del virus de Epstein-Barr (LMP1) parece imitar la acción de una proteína de

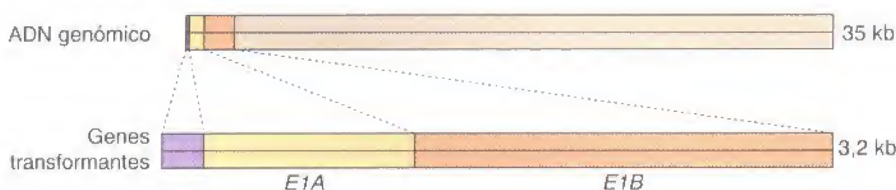



*Figura 15.16*
**Genoma de un adenovirus.** Dos genes de la región temprana, *E1A* y *E1B*, inducen la transformación.

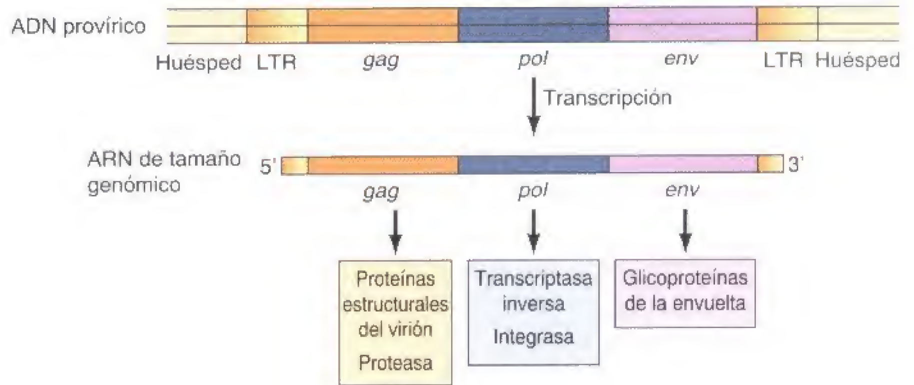



*Figura 15.17*
**Genoma de un retrovirus típico.** El ADN provírico integrado en el ADN celular se transcribe para dar lugar a un ARN de tamaño genómico. Este tránscrito primario servirá como ARN genómico de las nuevas partículas víricas, y como ARN mensajero de los genes *pol* y *gag*. Además, el ARN se corta y empalma para dar lugar al ARNm de *env*. El gen *gag* codifica la proteasa viral y las proteínas estructurales de las partículas víricas, *pol* codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, y *env* codifica las glicoproteínas de la envuelta.

la superficie celular de los linfocitos B que, en condiciones normales, señaliza la proliferación celular, pero la función de otras no se ha establecido.

El herpesvirus de ADN asociado al sarcoma de Kaposi se encuentra regularmente en células del sarcoma de Kaposi, y en estos tumores se expresan varios genes víricos que afectan a la proliferación y supervivencia celular. Resulta interesante que una de las proteínas transformantes del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, al igual que el antígeno T SV40, interacciona con Rb y p53.

### *Retrovirus*

Los **retrovirus** causan cáncer en una diversidad de especies animales, incluyendo al hombre. Un retrovirus humano, el virus tipo 1 linfotrópico humano de células T (HTLV-1), es el agente causante de la leucemia de células T de adultos, que es frecuente en partes de Japón, el Caribe y África. La transformación de los linfocitos T por el HTLV-1 se debe a la expresión del gen vírico *tax*, que codifica una proteína reguladora que afecta a la expresión de varios genes que controlan el crecimiento celular. El sida está causado por otro retrovirus, el IV. A diferencia del HTLV-1, el IV no causa cáncer de manera directa convirtiendo una célula normal en una célula tumoral. Sin embargo, los pacientes de sida sufren una elevada incidencia de algunos cánceres, particularmente linfomas y el sarcoma de Kaposi. Estos cánceres, que también son frecuentes en otros individuos inmunodeprimidos, están asociados con la infección por otros virus (p. ej., el virus de Epstein-Barr y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi), y parece ser que se desarrollan como una consecuencia secundaria de la inmunosupresión en los pacientes con sida.

Los distintos retrovirus difieren de manera sustancial en su potencial oncogénico. La mayoría de los retrovirus sólo contienen tres genes (*gag, pol* y *env*) que son necesarios para la replicación del virus, pero que no desempeñan ningún papel en la transformación celular (Fig. 15.17). Este tipo de retrovirus raramente induce tumores como consecuencia de las mutaciones debidas a la integración del ADN provírico dentro de los genes celulares, o junto a éstos.

Sin embargo, otros retrovirus contienen genes específicos que inducen la transformación celular y son potentes carcinógenos. El prototipo de estos retrovirus altamente oncogénicos es el **virus del sarcoma de Rous (RSV)**, que se aisló, por primera vez, en un sarcoma de pollo por Peyton Rous en 1911. Más de 50 años después, los estudios sobre el RSV condujeron a la identificación del primer oncogén vírico, lo que ha proporcionado un modelo para comprender muchas características del desarrollo de los tumores a nivel molecular.

## Oncogenes

El cáncer se debe a las alteraciones en determinados genes reguladores que controlan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Los estudios sobre los virus tumorales revelaron que unos genes específicos (denomi-

nados **oncogenes**) eran capaces de inducir la transformación celular, lo que proporcionó una primera aproximación a las bases moleculares del cáncer. Sin embargo, la mayoria de los cánceres humanos (aproximadamente el 80 %) no son inducidos por virus y surgen debido a otras causas, como la radiación y los carcinógenos químicos. Por lo tanto, para una comprensión completa del cáncer, ha sido fundamental que los estudios sobre los oncogenes víricos condujeran a la identificación de los oncogenes celulares, que están implicados en el desarrollo de aquellos cánceres no inducidos por virus. El nexo entre los oncogenes víricos y los celulares lo proporcionaron los estudios sobre los retrovirus altamente oncogénicos.

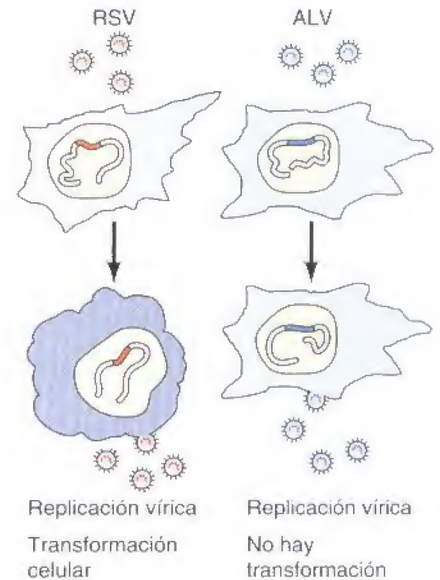



*Figura 15.18*
**Transformación celular por el RSV y por el ALV.** Tanto el RSV como el ALV infectan y se replican en los fibroblastos de embrión de pollo, pero sólo el RSV induce la transformación celular.

## *Oncogenes retrovíricos*

Los oncogenes víricos se definieron por primera vez en el RSV, que transforma a los fibroblastos de embrión de pollo en cultivo e induce grandes sarcomas una o dos semanas después de haber sido inoculado en pollos (Fig. 15.18). Por el contrario, el virus de la leucosis aviar (ALV), que está emparentado con el anterior, se replica en las mismas células que el RSV pero no induce su transformación. Esta diferencia en el potencial transformador sugería que el RSV podía contener información genética específica responsable de la transformación de las células infectadas. Una comparación directa de los genomas del RSV y del ALV apoyaba esta hipótesis: el ARN genómico del RSV tenía cerca de 10 kb, mientras que el del ALV era más pequeño, aproximadamente 8,5 kb.

A principios de los años 70, Peter Vogt y Steven Martin aislaron mutantes de deleción y mutantes sensibles a la temperatura del RSV, que eran incapaces de inducir la transformación. Sin embargo, estos mutantes se podían replicar normalmente en las células infectadas, lo que indica que el RSV contiene información genética necesaria para la transformación pero no para la replicación del virus. A partir del análisis de los mutantes de deleción y de los mutantes sensibles a la temperatura se caracterizó un único gen responsable de la capacidad del RSV de inducir tumores en aves y de transformar los fibroblastos en cultivo. Puesto que el RSV provoca *sarc*omas, su oncogén se denominó ***src***. El gen *src* es un añadido al genoma del RSV; no está presente en el ALV (Fig. 15.19). Codifica una proteína de 60 kDa que fue la primera proteína-tirosina quinasa identificada (véase experimento clave en el Cap. 13).

Se han aislado más de 40 retrovirus diferentes altamente oncogénicos, a partir de varios animales, incluyendo pollos, pavos, ratones, ratas, gatos y monos. Todos estos virus, al igual que el RSV, contienen al menos un oncogén (en algunos casos dos) que no es necesario para la replicación del virus pero que es el responsable de la transformación celular. En algunos casos, virus diferen-

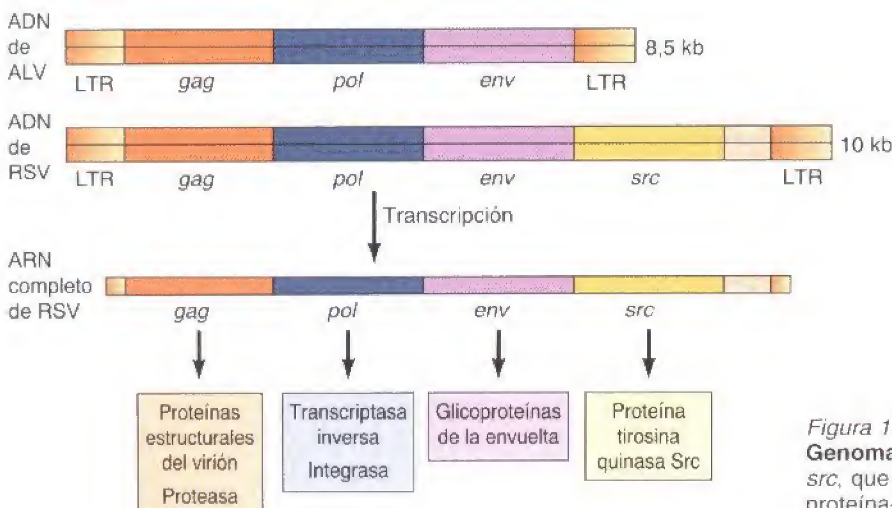



*Figura 15.19*
**Genoma del RSV.** El RSV contiene un gen adicional, *src*, que no está presente en el ALV, y que codifica la proteína-tirosina quinasa Src.

**TABLA 15.3.** Oncogenes retrovíricos

| Oncogén | Virus | Especie |
|---|---|---|
| *abl* | Leucemia de Abelson | Ratón |
| *akt* | Virus AKT8 | Ratón |
| *cbl* | Cas NS-1 | Ratón |
| *crk* | Sarcoma CT 10 | Pollo |
| *erb*A | Eritroblastosis aviar ES4 | Pollo |
| *erb*B | Eritroblastosis aviar ES4 | Pollo |
| *ets* | Eritroblastosis aviar E26 | Pollo |
| *fes* | Sarcoma felino de Gardner-Arnstein | Gato |
| *fgr* | Sarcoma felino de Gardner- Rasheed | Gato |
| *fms* | Sarcoma felino de McDonough | Gato |
| *fos* | Sarcoma osteogénico murino FBJ | Ratón |
| *fps* | Sarcoma de Fujinami | Pollo |
| *jun* | Sarcoma aviar 17 | Pollo |
| *kit* | Sarcoma felino de Hardy-Zuckerman | Gato |
| *maf* | Sarcoma aviar AS42 | Pollo |
| *mos* | Sarcoma de Moloney | Ratón |
| *mpl* | Leucemia mieloproliferativa | Ratón |
| *myb* | Mieloblastosis aviar | Pollo |
| *myc* | Mielocitomatosis aviar | Pollo |
| *p3k* | Sarcoma aviar 16 | Pollo |
| *qin* | Sarcoma aviar 31 | Pollo |
| *raf* | Sarcoma murino 3611 | Ratón |
| *ras*H | Sarcoma de Harvey | Rata |
| *ras*K | Sarcoma de Kirsten | Rata |
| *rel* | Reticuloendoteliosis | Pavo |
| *ros* | Sarcoma UR2 | Pollo |
| *sea* | Eritroblastosis aviar S13 | Pollo |
| *sis* | Sarcoma de simio | Mono |
| *ski* | SK aviar | Pollo |
| *src* | Sarcoma de Rous | Pollo |
| *yes* | Sarcoma Y73 | Pollo |

tes contienen los mismos oncogenes, pero se han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en estos virus (Tabla 15.3). Al igual que *src*, muchos de estos genes (como por ejemplo ***ras*** y ***raf***) codifican proteínas que ahora se sabe que son componentes de las vías de señalización que activan la proliferación celular (véase Fig. 13.32).

### Proto-oncogenes

Una característica inesperada de los oncogenes retrovíricos es que no están involucrados en la replicación del virus. Puesto que la mayoría de los virus están diseñados para replicarse de la manera más eficaz posible, la existencia de oncogenes virales que no son una parte integrante del ciclo vital del virus, supone una paradoja. Por lo tanto, los científicos se vieron obligados a preguntarse de dónde procedían los oncogenes retrovíricos y cómo se habían incorporado a los genomas virales —una línea de investigación que permitió identificar los oncogenes celulares en los cánceres humanos.

La primera pista acerca del origen de los oncogenes la proporcionó la manera de aislar los virus altamente oncogénicos. El aislamiento del virus de la leucemia de Abelson es un ejemplo típico (Fig. 15.20). Se inocularon más de 150 ratones con un virus no transformante que contenía solamente los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Uno de estos ratones desarrolló un linfoma a partir del cual se aisló un nuevo virus altamente oncogénico (el virus de la leucemia de Abelson), que ahora contenía un oncogén (*abl*). Se sugirió la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes de la célula huésped, y que ocasionalmente este gen se incorporaba al genoma vírico, dando lugar a un nuevo virus altamente oncogénico como resultado de un proceso de recombinación virus-huésped.

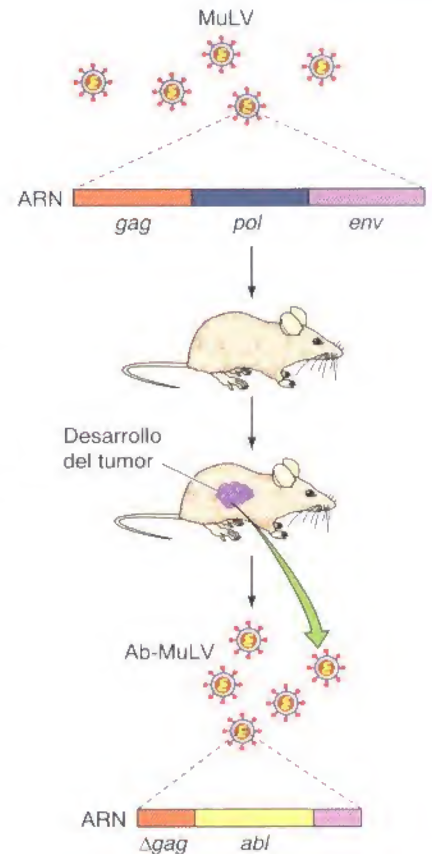



*Figura 15.20*
**Aislamiento del virus de la leucemia de Abelson.** El virus Ab-MuLV, que es un virus altamente oncogénico, se aisló a partir de un tumor poco habitual que se desarrolló en un ratón al que se le había inoculado un virus no transformante (el virus de la leucemia murina de Moloney, o MuLV). MuLV solo tenía los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la replicación del virus. Sin embargo, Ab-MuLV tenía un nuevo oncogén (*abl*), que era el responsable de su actividad transformante. El oncogén *abl* sustituía a algunos de los genes de la replicación del virus y se encontraba en el genoma de Ab-MuLV unido a un gen *gag* que tenía una deleción (se denominó Δ *gag*).

La propuesta clave de esta hipótesis era que las células normales contenían genes que estaban relacionados con los oncogenes retrovíricos. Esto se demostró definitivamente en 1976 por Harold Varmus, J. Michael Bishop, y col., que demostraron que una sonda de ADNc para el oncogén *src* del SRV hibridaba con secuencias relacionadas en el ADN de células normales de pollo. Más aun, se encontraron secuencias relacionadas con *src* en los ADN normales de un amplio grupo de vertebrados (incluidos los humanos), por lo que parecía que se habían conservado en la evolución. Experimentos similares con sondas para los oncogenes de otros retrovirus altamente oncogénicos han dado resultados similares, y actualmente está establecido que los oncogenes retrovíricos derivan de genes similares de células normales.

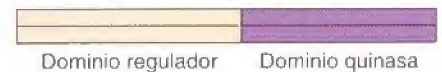
Los genes de las células normales a partir de los cuales se originan los oncogenes retrovíricos se denominan **proto-oncogenes**. Son genes reguladores importantes ya que en muchos casos codifican proteínas que intervienen en las vías de la transducción de señales que controlan la proliferación celular normal (p. ej., *src*, *ras* y *raf*). Los oncogenes son formas de sus correspondientes proto-oncogenes que se expresan de manera anormal o que han mutado. Debido a estas alteraciones, los oncogenes inducen una proliferación celular anormal y el desarrollo del tumor.

Un oncogén que se incorpora en un genoma retrovírico difiere en varios aspectos de su correspondiente proto-oncogén. En primer lugar, el oncogén vírico se transcribe bajo el control de las secuencias promotoras y activadoras del virus, en vez de ser controlado por las secuencias reguladoras de la transcripción del proto-oncogén. Por lo tanto, los oncogenes se expresan en niveles mucho mayores que los proto-oncogenes y a veces se transcriben en tipos celulares que no son los adecuados. En algunos casos, esas alteraciones de la expresión génica son suficientes para convertir un proto-oncogén que funciona normalmente en un oncogén que provoca la transformación celular.

Además de estas alteraciones en la expresión génica, los oncogenes suelen codificar proteínas que difieren en estructura y función de aquéllas codificadas por sus homólogos normales. Muchos oncogenes, como *raf*, se expresan como proteínas de fusión con secuencias virales en su extremo amino terminal (Fig. 15.21). Los procesos de recombinación que dan lugar a estas proteínas de fusión suelen ocurrir durante la captura de los proto-oncogenes por los retrovirus, y normalmente, durante el proceso, se delecionan secuencias de los extremos amino y carboxilo terminal de los proto-oncogenes. Estas deleciones pueden causar que se pierdan los dominios reguladores que controlan la actividad de las proteínas proto-oncogénicas, dando lugar a proteínas oncogénicas cuya función no está regulada. Por ejemplo, el oncogén vírico *raf* codifica una proteína de fusión en la que falta la secuencia amino terminal de la proteína normal Raf. Esta secuencia amino terminal es clave para la regulación normal de la actividad proteína quinasa de Raf, y su deleción da como resultado una actividad constitutiva no regulada de la proteína Raf codificada por el oncogén. Esta actividad no regulada de Raf provoca la proliferación celular, lo que da lugar a la transformación celular.

Muchos otros oncogenes difieren de sus correspondientes proto-oncogenes debido a mutaciones puntuales, dando lugar a la sustitución de un único ami-

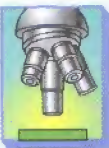
**Proteína proto-oncogénica Raf**




**Proteína oncogénica Raf**




*Figura 15.21*
**Proteína oncogénica Raf.** La proteína proto-oncogénica Raf está constituida por un dominio regulador amino terminal y por un dominio carboxilo terminal con actividad proteína quinasa. La proteína oncogénica viral Raf carece del dominio regulador, y éste es sustituido por una secuencia de la proteína vírica Gag. El resultado es que el dominio quinasa de Raf está constitutivamente activo, lo que causa la transformación celular.



## Experimento clave

# Descubrimiento de los proto-oncogenes

**Un ADN relacionado con el(los) gen(es) transformante(s) del virus del sarcoma aviar se encuentra en el ADN de las aves sanas**
Dominique Stehelin, Harold. E Varmus, J. Michael Bishop y Peter K. Vogt
Departamento de microbiología, universidad de California, San Francisco (DS, HEV, y JMB) y departamento de microbiología, Universidad de California, Los Ángeles (PKV)
*Nature, Volumen 260, 1976, págs. 170-173*

### Contexto

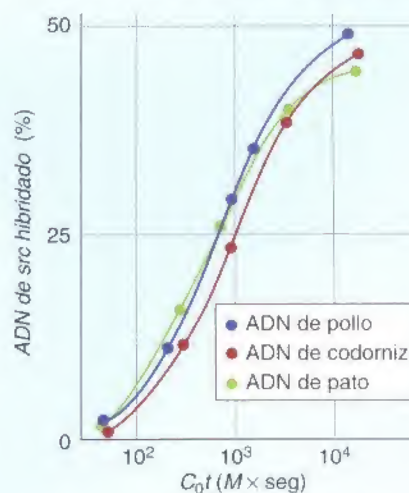
Mediante el análisis genético del RSV se determinó que el primer oncogén vírico (*src*) era un gen responsable de la transformación celular pero que no se requería para la replicación del virus. El hecho de que algunos retrovirus altamente oncogénicos se originaran a partir de los tumores de animales infectados hizo que se propusiera la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos procedían de genes similares que se encontraban en las células hospedadoras. El hecho de que, mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, se encontraran secuencias de ADN similares a las de los retrovirus en las células normales de varias especies, reafirmaba esta hipótesis. Sin embargo, no estaba claro si estas secuencias eran similares a los oncogenes retrovíricos o a los genes necesarios para la replicación.

Harold Varmus, J. Michael Bishop y col. resolvieron este dilema aprovechando la caracterización genética del oncogén *src*. Concretamente, Peter Vogt ya había aislado mutantes de transformación defectuosa del RSV que tenían deleciones de cerca de 1,5 kb que correspondían a casi todo o a todo el gen *src*. Stehelin y cols. prepararon una sonda de ADNc para secuencias específicas de *src*. La utilización de esta sonda en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos les permitió demostrar de manera definitiva que las células normales contienen secuencias de ADN similares a *src*.

### Experimentos

En primer lugar, se utilizó la transcriptasa inversa para sintetizar una sonda de ADNc radiactivo, constituido por cortos fragmentos de ADN monocatenario complementarios al ARN genómico del RSV. Esta sonda se hibridó a un exceso de ARN purificado a partir de un mutante de deleción de transformación defectuosa. Los fragmentos de ADNc que eran complementarios a los genes virales de la replicación se hibridaron al ARN del RSV de transformación defectuosa, formándose moléculas de heterodúplex ARN-ADN. Por el contrario, los fragmentos de ADNc que eran complementarios a *src* no se hibridaron y permanecieron como una única cadena. Entonces se aisló este ADN monocatenario para generar una sonda específica de la secuencia oncogénica *src*. Tal y como se había predicho a través del tamaño de las deleciones en los mutantes de transformación defectuosa de RSV, la sonda específica de *src* era homóloga a un fragmento de cerca de 1,5 kb del ARN de RSV.

A continuación, el ADNc de *src* radiactivo se utilizó como una sonda de hibridación para detectar secuencias de ADN similares en células de ave normales. De manera sorprendente, el ADNc de *src* se hibridó con el ADN de pollos normales así como con el ADN de otras especies de aves (véase Figura). De esta manera estos experimentos demostraron que las células normales contenían secuencias de ADN que estaban íntimamente relacionadas con el oncogén *src*, lo que apoyaba la hipótesis de que los oncogenes retrovíricos se originaban a partir de genes celulares que se incorporaban al genoma del virus.



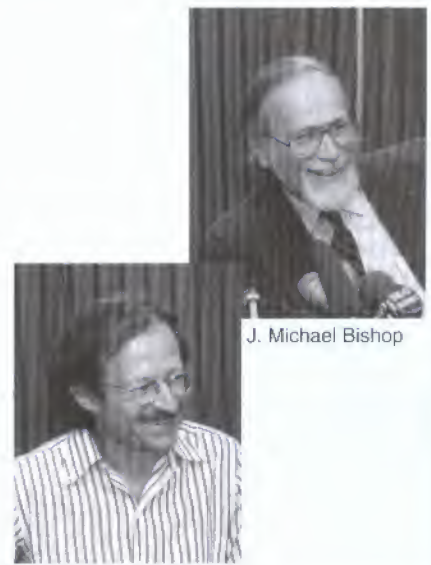

Hibridación del ADNc específico de *src* con el ADN de pollo, codorniz y pato normales.

noácido en los productos oncogénicos. En algunos casos, la consecuencia de estas sustituciones de los aminoácidos (como las deleciones ya tratadas) es que no se regule la actividad de la proteína oncogénica. Un ejemplo importante de estas mutaciones puntuales lo proporcionan los oncogenes *ras*, que se tratarán en la siguiente sección al hablar de su papel en los cánceres humanos.

### *Descubrimiento de los proto-oncogenes* (continuación)

**Impacto**

El artículo de Stehelin y cols. publicado en 1976 finalizaba proponiendo la posibilidad de que ¡las secuencias celulares *src* intervengan en la regulación del desarrollo y del crecimiento de las células normales, o en la transformación del comportamiento celular debida a agentes físicos, químicos o virales! Esta propuesta ha sido confirmada, y el descubrimiento de las secuencias celulares *src* abrió las puertas a la comprensión de la regulación de la proliferación de las células normales y de la base molecular del cáncer humano. Los estudios de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, incluyendo a la propia Src, han resultado ser fundamentales para desentrañar las vías de señalización que controlan la proliferación y diferenciación de las células normales. El descubrimiento del proto-oncogén *src* sugería aun más, que los tumores no inducidos por virus se podían generar debido a mutaciones en genes celulares similares, lo que condujo directamente al descubrimiento de los oncogenes en los tumores humanos. Los resultados de Varmus, Bishop y col. supusieron la unificación de los estudios sobre los virus tumorales, sobre las células normales y sobre los tumores no inducidos por virus; esto implica que han afectado a prácticamente todos los aspectos de la investigación sobre el cáncer y sobre la regulación celular.




## *Los oncogenes en el cáncer en el hombre*

Tras comprender el origen de los oncogenes retrovíricos, la siguiente cuestión era saber si los tumores que no eran inducidos por los virus contenían oncogenes celulares que se hubieran generado a partir de proto-oncogenes por mutaciones o por reordenamientos del ADN durante el desarrollo del tumor. La primera evidencia acerca del papel de los oncogenes celulares en los tumores humanos se obtuvo mediante experimentos de transferencia génica en los laboratorios de Robert Weinberg y del autor en 1981. Se encontró que el ADN de un carcinoma de vejiga humano inducía la transformación de las células en cultivo receptoras, lo que indicaba que el tumor humano contenía un oncogén celular biológicamente activo (Fig. 15.22). Desde entonces, mediante ensayos de transferencia génica y mediante otras técnicas experimentales alternativas, se han detectado oncogenes celulares activos en diferentes tipos de tumores humanos (Tabla 15.4).

Algunos de los oncogenes que se han identificado en tumores humanos son homólogos celulares de los oncogenes que previamente se caracterizaron en retrovirus, mientras que otros son oncogenes nuevos que se han descubierto por primera vez en los cánceres humanos. El primer oncogén humano identificado en los ensayos de transferencia génica fue posteriormente identificado como el homólogo humano del oncogén *ras*H del virus del sarcoma de Harvey (véase Tabla 15.3). Tres miembros relacionados de la familia de los genes *ras* (*ras*H, *ras*K y *ras*N) son los oncogenes que se encuentran con mayor frecuencia en los tumores humanos. Estos genes están implicados en aproximadamente el 20 % de todos los cánceres humanos, incluyendo cerca del 50 % de los cánceres de colon y el 25 % de los carcinomas de pulmón.

Los oncogenes *ras* no se encuentran en las células normales; se generan en las células tumorales como consecuencia de mutaciones que ocurren durante

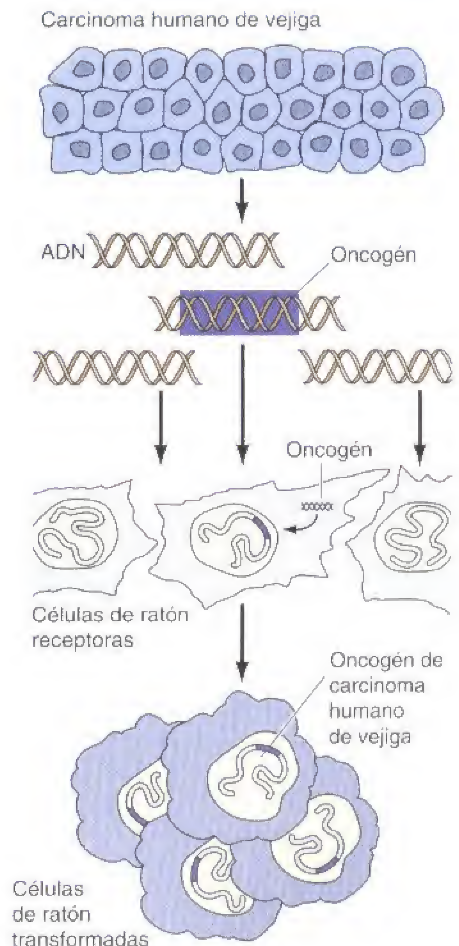



*Figura 15.22*
**Detección de un oncogén de un tumor humano mediante transferencia génica.** El ADN extraído de un carcinoma humano de vejiga indujo la transformación de células de ratón receptoras en cultivo. La transformación se debió a la integración y a la expresión de un oncogén procedente del tumor humano.

**TABLA 15.4.** Oncogenes representativos de tumores humanos

| Oncogén | Tipo de cáncer | Mecanismo de activación |
|---|---|---|
| *abl* | Leucemia mielogénica crónica, leucemia linfocítica aguda | Translocación |
| *akt* | Carcinomas de ovario y de páncreas | Amplificación |
| *bcl-2* | Linfoma de las células B foliculares | Translocación |
| *D1* | Adenoma de la glándula paratiroides, linfoma de las células B | Translocación |
| *D1* | Carcinomas de las células escamosas, de vejiga, de mama, de esófago, de hígado y de pulmón | Amplificación |
| *E2A/pbx1* | Leucemia linfocítica aguda | Translocación |
| *erb*B-2 | Carcinomas de mama y de ovario | Amplificación |
| *gip* | Carcinomas de ovario y de corteza suprarrenal | Mutación puntual |
| *gli* | Glioblastoma | Amplificación |
| *gsp* | Tumores de la hipófisis y del tiroides | Mutación puntual |
| *hox*-11 | Leucemia de células T aguda | Translocación |
| *lyl* | Leucemia de células T aguda | Translocación |
| c-*myc* | Linfoma de Burkitt | Translocación |
| c-*myc* | Carcinomas de mama y de pulmón | Amplificación |
| L-*myc* | Carcinoma de pulmón | Amplificación |
| N-*myc* | Neuroblastoma y carcinoma de pulmón | Amplificación |
| *PDGFR* | Leucemia mielomonocítica crónica | Translocación |
| *PI3K* | Carcinoma ovárico | Amplificación |
| *PML/RAR*$\alpha$ | Leucemia promielocítica aguda | Translocación |
| *raf*-B | Melanoma, carcinoma de colon | Mutación puntual |
| *ras*H | Carcinoma de tiroides | Mutación puntual |
| *ras*K | Carcinomas de colon, pulmón, páncreas y tiroides | Mutación puntual |
| *ras*N | Leucemias mielogénica aguda y linfocítica, carcinoma de tiroides | Mutación puntual |
| *ret* | Neoplasia endocrina múltiple tipos 2A y 2B | Mutación puntual |
| *ret* | Carcinoma de tiroides | Reorganización del ADN |
| *SMO* | Carcinoma de células basales | Mutación puntual |

el desarrollo del tumor. Los oncogenes *ras* difieren de sus proto-oncogenes en mutaciones puntuales cuya consecuencia es la sustitución de un único aminoácido en posiciones clave. La primera de estas mutaciones que se descubrió fue la sustitución de valina en lugar de glicina en la posición 12 (Fig. 15.23). También se encuentran frecuentemente en los oncogenes *ras* de tumores humanos otras sustituciones de aminoácidos en la posición 12, así como en las posiciones 13 y 61. En los modelos animales se ha encontrado que las mutaciones que convierten los proto-oncogenes *ras* a oncogenes son causadas por carcinógenos químicos, lo que proporciona un vínculo directo entre la acción mutagénica de los carcinógenos y la transformación celular.

Como ya se trató en el Capítulo 13, los genes *ras* codifican proteínas de unión a nucleótidos de guanina que intervienen en la transducción de las señales mitogénicas a partir de diversos receptores de factores de crecimiento. La actividad de las proteínas Ras está controlada por la unión de GTP o GDP, de tal manera que alternan entre el estado activo (unidas a GTP) e inactivo (unidas a GDP) (véase Fig. 13.33). Las mutaciones características de los oncogenes *ras* tienen el efecto de mantener las proteínas Ras en la conformación activa unidas a GTP. En gran medida, esto se debe a que se anula la respuesta de las proteínas oncogénicas Ras a GAP (proteína activadora de la GTPasa), que activa la hidrólisis del GTP unido a Ras. Debido a que disminuye su actividad GTPasa intracelular, las proteínas oncogénicas Ras permanecen en su estado activo unidas a GTP y provocan la proliferación celular incontrolada.

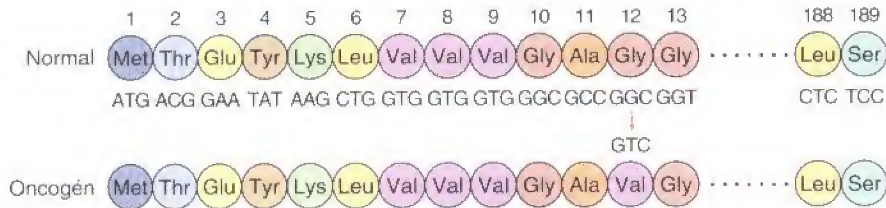



*Figura 15.23*
**Mutaciones puntuales en los oncogenes *ras*.** Un único cambio de nucleótidos, que hace que el codón 12 cambie de GGC (Gly) a GTC (Val), es la causa de la actividad transformante del oncogén *ras* H detectado en el ADN del carcinoma de vejiga.

Las mutaciones puntuales son solamente una de las maneras en las que los proto-oncogenes se convierten en oncogenes en los tumores humanos. Muchas células cancerosas muestran alteraciones en la estructura cromosómica, incluyendo translocaciones, duplicaciones y deleciones. Los reordenamientos génicos que resultan de la translocación cromosómica suelen tener como consecuencia la generación de oncogenes. En algunos casos, tras el análisis de estos reordenamientos se ha encontrado que en el desarrollo del tumor están implicados oncogenes ya conocidos. En otros casos, tras el análisis de las secuencias de ADN reordenadas y tras su clonaje molecular, se han encontrado oncogenes nuevos.

El primer caso caracterizado de la activación de un oncogén por translocación cromosómica fue el del oncogén **c-*myc*** en el linfoma de Burkitt humano y en plasmocitomas de ratón, que son cánceres de los linfocitos B productores de anticuerpos (Fig. 15.24). Ambos tumores se caracterizan por translocaciones cromosómicas en las que se ven implicadas genes que codifican inmunoglobulinas. Por ejemplo, en casi todos los linfomas de Burkitt se ha producido la translocación de un fragmento del cromosoma 8 a uno de los *loci* de las inmunoglobulinas, que se localizan en los cromosomas 2 (cadena ligera $\kappa$), 14 (cadena pesada) y 22 (cadena ligera $\kappa$). El hecho de que los genes de las inmunoglobulinas se expresen activamente en estos tumores sugiere que las translocaciones activan un proto-oncogén del cromosoma 8 mediante su inserción en los *loci* de

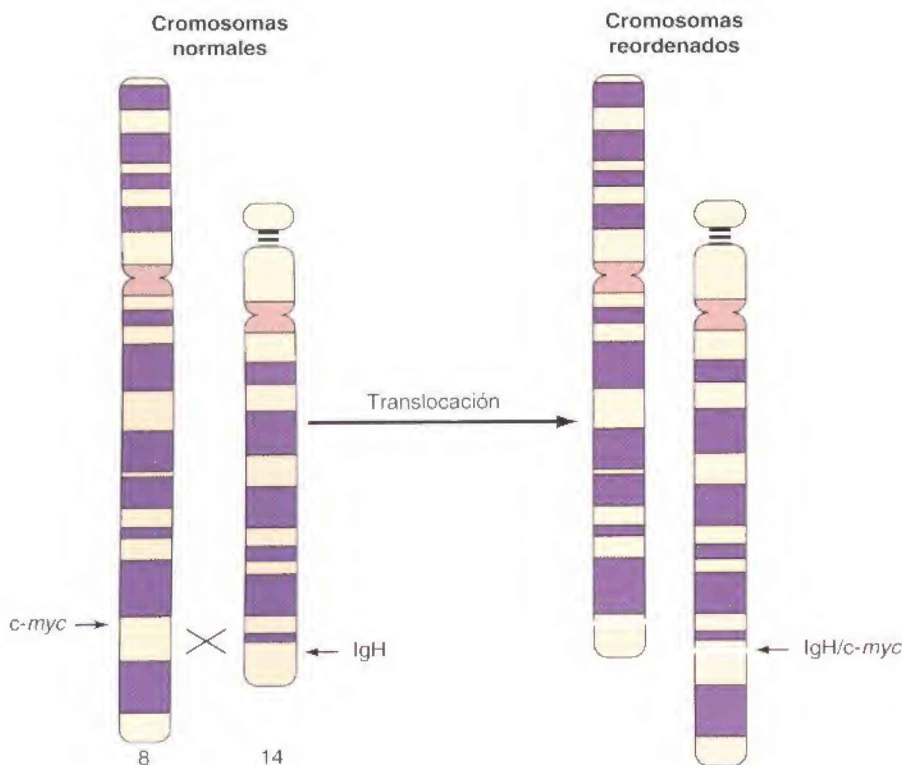
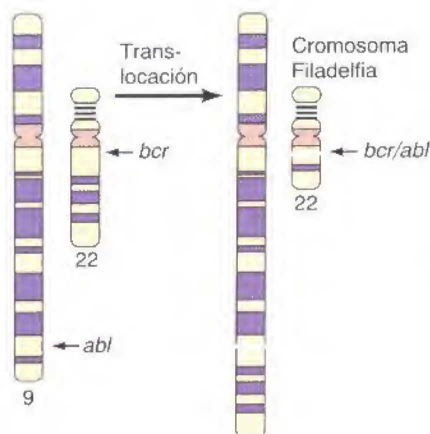



*Figura 15.24*
**Translocación de c-*myc*.** En el linfoma de Burkitt, el proto-oncogén c-*myc* se transloca desde el cromosoma 8 al *locus* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) en el cromosoma 14; esto origina una expresión anormal de c-*myc*.



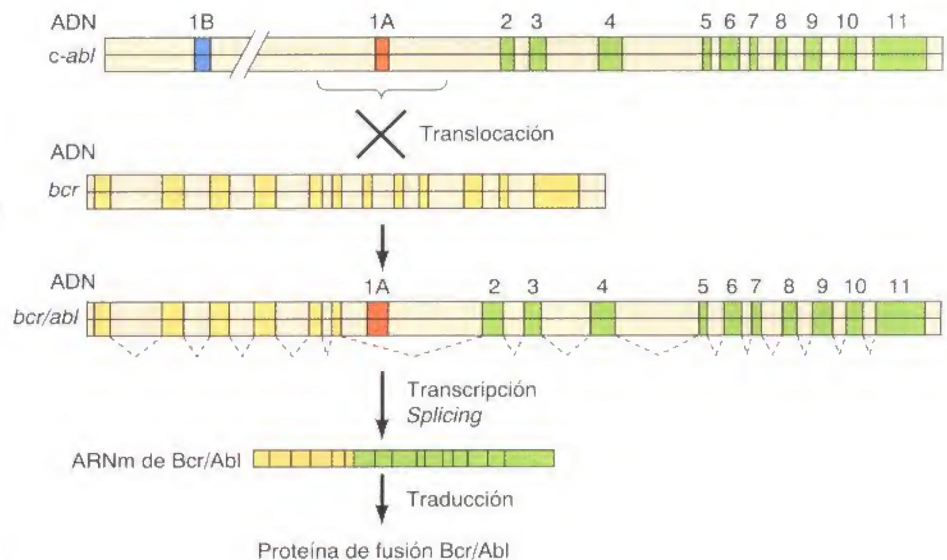




*Figura 15.25*
**Translocación de *abl*.** El oncogén *abl* se transloca desde el cromosoma 9 al cromosoma 22 formando el cromosoma Filadelfia en las leucemias mielogénicas crónicas. El proto-oncogén *abl*, que tiene dos exones iniciales alternativos (1A y 1B), se integra en la mitad del gen *bcr* del cromosoma 22. El exón 1B se deleciona a consecuencia de la translocación. La transcripción del gen fusionado se inicia en el promotor de *bcr* y sigue a lo largo de *abl*. El *splicing* da lugar a un ARNm Bcr/Abl, en el que se ha delecionado el exón 1A de *abl* y las secuencias de *bcr* se han unido al exón 2 de *abl*. El ARNm Bcr/Abl se traduce para dar lugar a una proteína recombinante Bcr/Abl de fusión.

las inmunoglobulinas. Esto se investigó mediante el análisis de los ADNs de tumores con sondas para oncogenes conocidos, y se descubrió que el proto-oncogén c-*myc* era el punto de ruptura de la translocación del cromosoma 8 en el linfoma de Burkitt. Estas translocaciones insertaban a c-*myc* en un *locus* de la inmunoglobulina, donde se expresaba de una manera incontrolada. El gen c-*myc* codifica un factor de transcripción que se induce como respuesta a la estimulación por un factor de crecimiento, por lo que su expresión incontrolada basta para provocar la proliferación celular y contribuir al desarrollo del tumor.

Las translocaciones de otros proto-oncogenes dan como resultado reordenamientos de secuencias codificantes, lo que conduce a la formación de productos génicos alterados. El caso típico de esto es la translocación del proto-oncogén ***abl*** desde el cromosoma 9 al cromosoma 22, en la leucemia mielogénica crónica (Fig. 15.25). Esta translocación provoca la fusión de *abl* con su compañero de translocación, un gen denominado *bcr*, en el cromosoma 22. La consecuencia es que se produce una proteína de fusión Bcr-Abl en la que el extremo amino terminal normal de la proteína proto-oncogénica Abl se ha sustituido por unas secuencias de aminoácidos de Bcr. La fusión de las secuencias de Bcr da como resultado en una actividad incontrolada de la proteína-tirosina quinasa Abl, lo que provoca la transformación celular.

Un mecanismo diferente mediante el que los oncogenes se activan en los tumores humanos es la amplificación génica, que da como resultado una expresión génica elevada. La amplificación génica (véase Fig. 5.54) es frecuente en las células tumorales, con una frecuencia mil veces mayor que en las células normales, y la amplificación de los oncogenes puede desempeñar un papel en la progresión de muchos tumores hacia un crecimiento más rápido y un mayor carácter maligno. Así, se han identificado nuevos oncogenes mediante el clonaje molecular y la caracterización de secuencias de ADN que se encuentran amplificadas en tumores.

Un ejemplo claro de la amplificación oncogénica es la del gen **N-*myc***, que está relacionado con c-*myc*, el cual está implicado en el neuroblastoma (un tumor infantil de células neuronales embrionarias). Copias amplificadas de N-*myc* aparecen con frecuencia en los tumores de crecimiento rápido, lo que indica que la amplificación de N-*myc* está vinculada a la progresión de los neuroblastomas hacia una mayor malignidad. La amplificación de otro oncogén, ***erb*B-2**, que codifica un receptor proteína-tirosina quinasa, igualmente se relaciona con la progresión de los carcinomas de mama y de ovarios.

## *Funciones de los productos oncogénicos*

Los oncogenes virales y los celulares definen un gran grupo de genes (alrededor de 100 en total) que contribuyen al comportamiento anormal de las células cancerosas. Como ya se ha dicho, muchas de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes regulan la proliferación celular normal; en estos casos, la mayor expresión o la mayor actividad de la proteína oncogénica correspondiente produce la proliferación incontrolada de las células cancerosas. Otros productos oncogénicos contribuyen a otros aspectos del comportamiento de las células cancerosas, como por ejemplo, una diferenciación defectuosa o la incapacidad de sufrir la muerte celular programada.

La mayor parte de las proteínas oncogénicas funcionan como componentes de las vías de señalización que regulan la proliferación celular y la supervivencia en respuesta a la estimulación por los factores de crecimiento. Estas proteínas oncogénicas incluyen a factores de crecimiento polipeptídicos, a receptores de los factores de crecimiento, a componentes de las vías de señalización intracelular, y a factores de transcripción (Fig. 15.26).

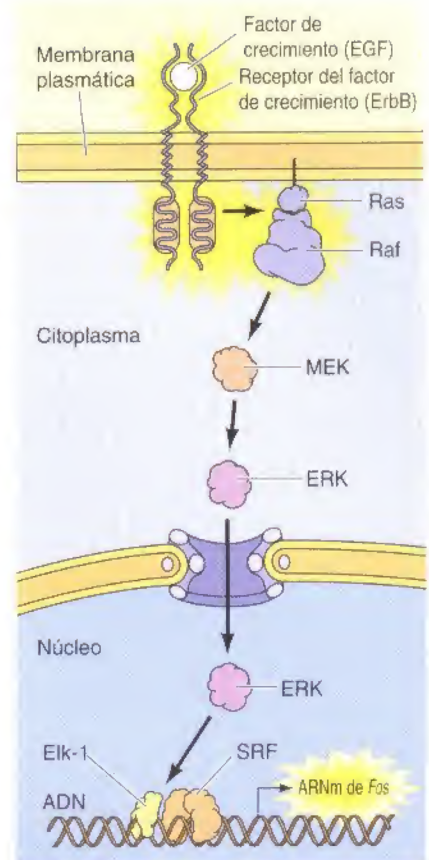



*Figura 15.26*
**Oncogenes y transducción de señales.** Las proteínas oncogénicas actúan como factores de crecimiento (p. ej., EGF), como receptores de los factores de crecimiento (p. ej., ErbB), y como moléculas señalizadoras intracelulares (Ras y Raf). Ras y Raf activan la vía de la quinasa MAP ERK (véanse Figs. 13.32 y 13.35), lo que supone la inducción de otros genes (p. ej., *fos*) que codifican proteínas reguladoras de la transcripción potencialmente oncogénicas. Las proteínas de las que se conoce su potencial oncogénico se resaltan en amarillo.

La acción de los factores de crecimiento como proteínas oncogénicas se debe a su expresión anormal, lo que conduce a una situación en la que la célula tumoral produce un factor de crecimiento al cual también responde. El resultado es una estimulación autocrina de la célula productora del factor de crecimiento (véase Fig. 15.9), lo que causa la proliferación anormal de la célula y contribuye al desarrollo de una gran variedad de tumores humanos.

Un gran grupo de oncogenes codifica receptores de factores de crecimiento, la mayoría de los cuales son proteína-tirosina quinasas. Estos receptores se suelen convertir en proteínas oncogénicas al sufrir alteraciones en sus dominios amino terminales, los cuales normalmente unirían factores de crecimiento extracelulares. Por ejemplo, el receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) se convierte en un oncogén en algunas leucemias humanas debido a una translocación cromosómica en la que el extremo amino terminal normal del receptor de PDGF se sustituye por una secuencia amino terminal de un factor de transcripción denominado Tel (Fig. 15.27). Las secuencias Tel de la proteína de fusión Tel/PDGFR resultante se dimerizan aunque no se le una el factor de crecimiento, lo que supone activar de manera constitutiva al dominio quinasa intracelular y la generación incontrolada de una señal proliferativa. Por otro lado, los genes que codifican algunos receptores proteína-tirosina quinasas, como el *erb*B-2, se activan por amplificación génica. Otros oncogenes (incluidos *src* y *abl*) codifican proteína-tirosina quinasas no receptoras que están continuamente activadas debido a deleciones o mutaciones de sus secuencias reguladoras.

Las proteínas Ras desempeñan un papel fundamental en la señalización de la mitosis, acoplando los receptores de los factores de crecimiento a la activación de la proteína-serina/treonina quinasa Raf, lo que inicia una cascada de proteína quinasas que conduce a la activación de la quinasa MAP ERK (véase Fig. 13.32). Como ya se trató anteriormente, las mutaciones que convierten a los proto-oncogenes *ras* en oncogenes provocan una activación continua de Ras, lo que lleva a la activación de la vía ERK. De igual manera, el gen *raf* se puede convertir en un oncogén debido a deleciones que suponen la pérdida del dominio regulador amino terminal de la proteína Raf (véase Fig. 15.21). La consecuencia de estas deleciones es la actividad incontrolada de la proteína quinasa Raf, lo que también conduce a la activación constitutiva de ERK. Alternativamente, los protooncogenes *raf* pueden convertirse en oncogenes por mutaciones puntuales que resultan en una elevada actividad de la quinasa Raf.

La vía de las quinasas ERK lleva, en última instancia, a la fosforilación de factores de transcripción y a alteraciones en la expresión génica. Por lo tanto, como se podría suponer, muchos oncogenes codifican proteínas reguladoras de la transcripción que en condiciones normales se inducen en respuesta a la activación por factores de crecimiento. Por ejemplo, la transcripción del proto-on-

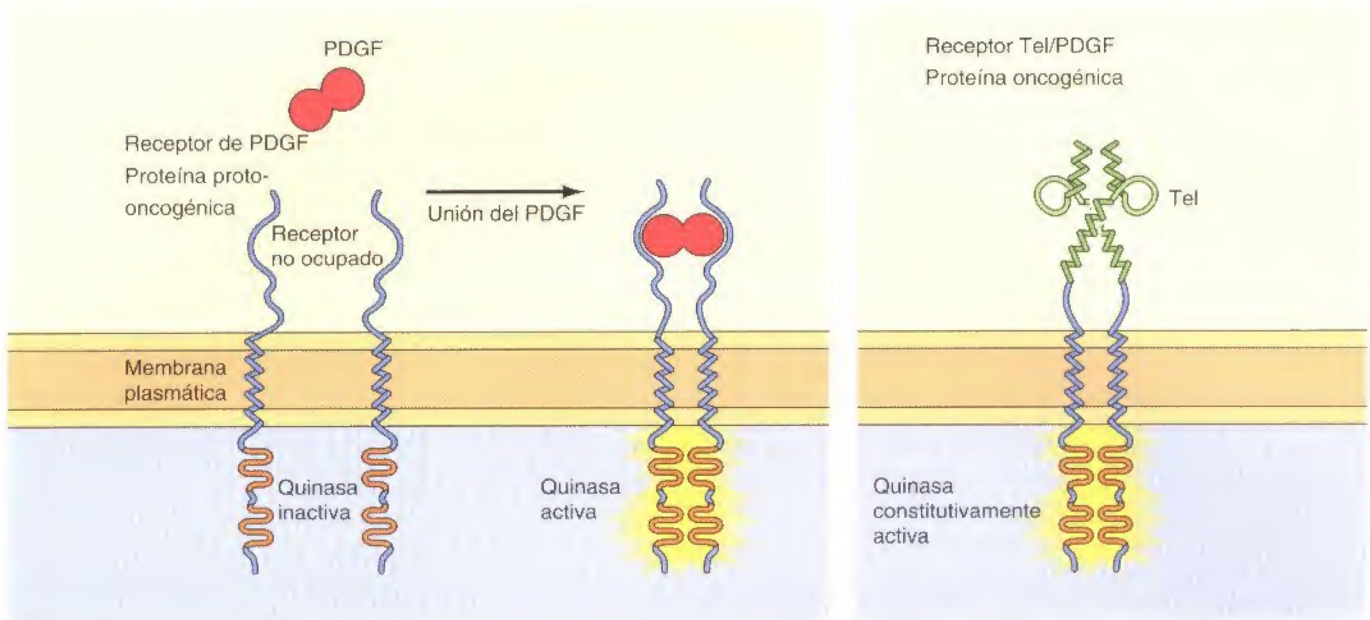



*Figura 15.27*
**Mecanismo de la activación del oncogén *Tel/PDGFR*.** El receptor de PDGF normal (PDGFR) se activa por una dimerización inducida por la unión del PDGF. El oncogén *Tel/PDGFR* codifica una proteína de fusión en la que el dominio extracelular normal del receptor de PDGF es sustituido por la secuencia amino terminal del factor de transcripción Tel, que incluye su dominio de dimerización hélice-bucle-hélice (véase Fig. 6.27). Esta secuencia se dimeriza en ausencia de PDGF, lo que supone la activación constitutiva de la proteína quinasa oncogénica.

cogén *fos* se activa debido a la fosforilación de Elk-1 por la quinasa MAP ERK (véase Fig. 15.26). **Fos** y el producto de otro proto-oncogén, **Jun**, son componentes del factor de transcripción AP-1, que activa la transcripción de varios genes diana en las células estimuladas por factores de crecimiento (Fig. 15.28). La actividad constitutiva de AP-1, debida a la expresión incontrolada de las proteínas oncogénicas Fos o Jun, es suficiente para producir la proliferación celular anormal que dará lugar a la transformación celular. De manera similar, las proteínas Myc funcionan como factores de transcripción regulados por estímulos mitogénicos, y la expresión anormal de los oncogenes *myc* contribuye al desarrollo de varios tumores humanos. En los linfomas y leucemias humanas, otros factores de transcripción se suelen activar a oncogenes debido a translocaciones cromosómicas.

Los componentes de otras vías de señalización, incluidos Hedgehog, Wnt, Notch y vías de señalización acopladas a proteínas G, también pueden actuar como oncogenes. Por ejemplo, las mutaciones del gen que codifica el receptor de tirotropina acoplado a proteínas G lo convierten en un oncogén en tumores de tiroides (Fig. 15.29). La tirotropina es una hormona de la hipófisis que estimula la proliferación de las células tiroideas a través de un receptor acoplado a proteínas G que activa a la adenilato ciclasa. Las mutaciones del receptor de la tirotropina en los tumores de tiroides originan en una actividad constitutiva del receptor, lo que provoca la proliferación celular a través de la activación de la vía señalizadora del AMPc. De igual manera, los genes que codifican las proteínas G pueden actuar como oncogenes en algunos tipos celulares. El oncogén *gsp*, que codifica la subunidad $\alpha$ de $G_s$, se genera debido a mutaciones puntuales similares a aquéllas que se encontraron en *ras*. La consecuencia de estas mutaciones es una actividad constitutiva de la subunidad $\alpha$ de $G_s$, lo que conduce a una activación incontrolada de la adenilato ciclasa. Como podría esperarse, el oncogén *gsp* está implicado en los tumores de hipófisis y de tiroides, donde el AMPc estimula la proliferación celular. En otros tipos celulares, incluyendo los tumores de ovario y de suprarrenales, los genes que codifican las subunidades $\alpha$ de otras proteínas G son convertidos en oncogenes como consecuencia de mutaciones similares.

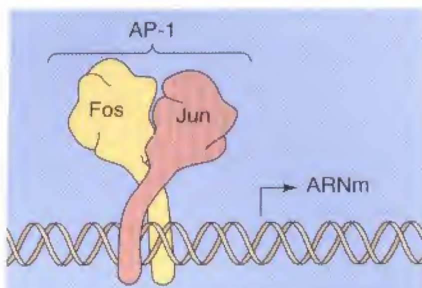



*Figura 15.28*
**Factor de transcripción AP-1.** Fos y Jun se dimerizan para constituir AP-1 que activa la transcripción de diversos genes inducibles por factores de crecimiento.

Las vías de señalización intracelular que se activan mediante una estimulación por factores de crecimiento regulan, en última instancia, los componentes de la maquinaria del ciclo celular que inducen la progresión a través del punto de restricción en $G_1$. Las ciclinas de tipo D se activan en respuesta a la estimula-

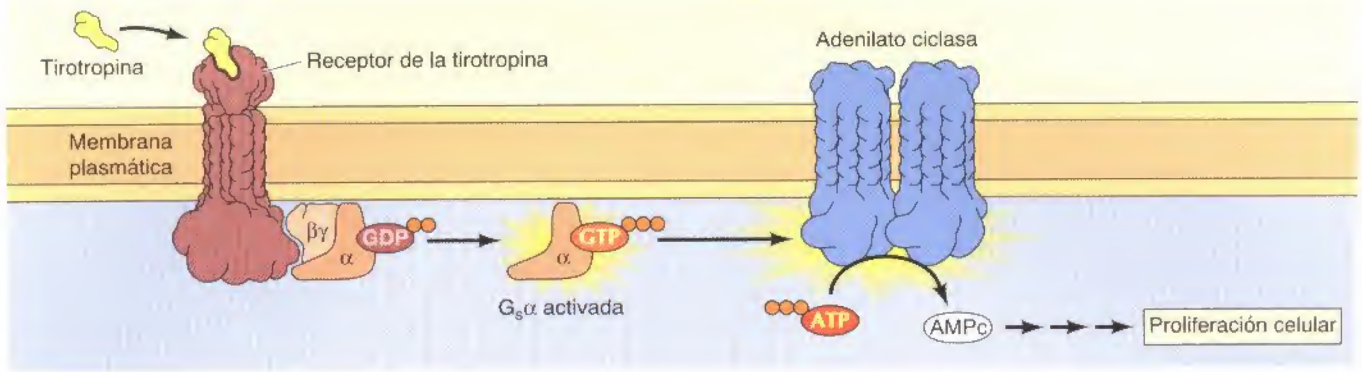



*Figura 15.29*
**Actividad oncogénica de los receptores asociados a proteínas G y de las proteínas G.** El receptor de la tirotropina está acoplado a la adenilato ciclasa a través de $G_s$. Los genes que codifican el receptor y la subunidad $\alpha$ de $G_s$ ($G_s\alpha$) pueden actuar como oncogenes estimulando la proliferación de las células del tiroides.

ción por los factores de crecimiento y desempeñan un papel fundamental como vínculos entre la señalización a través de dichos factores de crecimiento y la progresión del ciclo celular (véase Fig. 14.19). No debe sorprender que el gen que codifica la ciclina D1 sea un proto-oncogén, que se puede activar para dar lugar a un oncogén (denominado ***D1***) mediante una translocación cromosómica o amplificación génica. Estas alteraciones conducen a la expresión constitutiva de la ciclina D1, lo que induce la proliferación celular en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento.

Aunque la mayoría de los oncogenes estimulan la proliferación celular, sin embargo la actividad oncogénica de algunos factores de transcripción se debe a que inhiben la diferenciación celular. Como ya se mencionó en el Capítulo 13, la hormona tiroidea y el ácido retinoico inducen la diferenciación de varios tipos celulares. Estas hormonas difunden a través de la membrana plasmática y se unen a los receptores intracelulares que actúan como moléculas reguladoras de la transcripción. Las formas mutadas del receptor de la hormona tiroidea (**ErbA**) y del receptor del ácido retinoico (**PML/RARα**) intervienen como proteínas oncogénicas en la eritroleucemia de los pollos y en la leucemia promielocítica aguda humana, respectivamente. En ambos casos, parece ser que los receptores oncogénicos mutados interfieren con la acción de sus homólogos normales, bloqueando la diferenciación celular y manteniendo las célu-

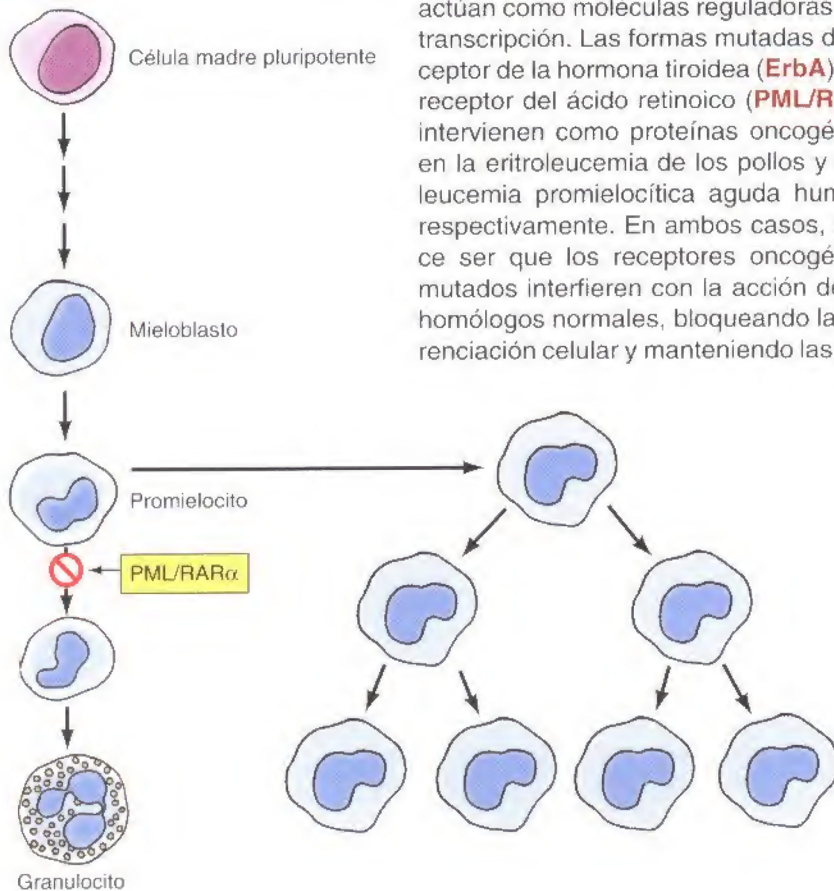



*Figura 15.30*
**Acción de la proteína oncogénica PML/RARα.** La proteína de fusión PML/RARα bloquea la diferenciación de los promielocitos a granulocitos.

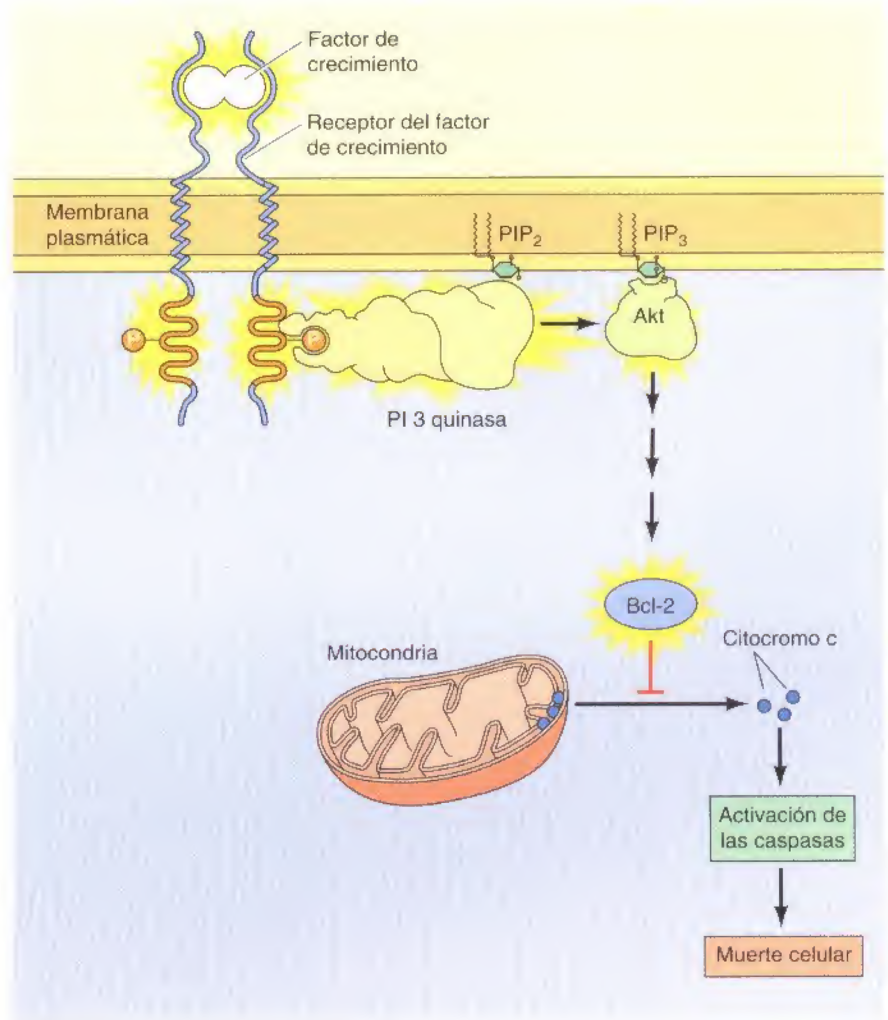



*Figura 15.31*
**Oncogenes y supervivencia celular.** Entre las proteínas oncogénicas que actúan como señales de supervivencia celular se incluyen factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, la PI 3 quinasa y Akt. La señalización mediante la vía de la PI 3 quinasa/Akt regula a los miembros de la familia de Bcl-2 que promueven la supervivencia celular inhibiendo la liberación del citocromo *c* de la mitocondria. Las proteínas con potencial oncogénico aparecen resaltadas en amarillo.

las leucémicas proliferando de manera activa (Fig. 15.30). En el caso de la leucemia promielocítica aguda, unas altas dosis de ácido retinoico pueden vencer el efecto de la proteína oncogénica PML/RARα e inducir la diferenciación de las células leucémicas. Esta observación biológica tiene una implicación clínica: se puede tratar de manera efectiva a los pacientes con leucemia promielocítica aguda administrándoles ácido retinoico, que induce la diferenciación y bloquea la proliferación celular.

Como ya se trató anteriormente en este Capítulo, la incapacidad de las células cancerosas de sufrir la muerte celular programada, o apoptosis, es un factor crítico en el desarrollo de tumores, y varios oncogenes codifican proteínas que intervienen promoviendo la supervivencia celular (Fig. 15.31). La supervivencia de la mayoría de las células animales depende de su estimulación por los factores de crecimiento, por lo que aquellos oncogenes que codifican factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y proteínas señalizadoras como Ras, intervienen no sólo estimulando la proliferación celular sino también evitando la muerte celular. Como ya se trató en el Capítulo 13, la vía de señalización de la PI 3-quinasa/Akt desempeña un papel fundamental en la prevención de la apoptosis de muchas células dependientes de los factores de crecimiento, y los genes que codifican la **PI 3-quinasa** y **Akt** actúan como oncogenes en los retrovirus y en algunos tumores humanos. Entre las dianas de la PI 3-quinasa/Akt se incluye un miembro de la familia Bcl-2 (Bad), y hay que destacar que **Bcl-2** fue descubierto como un oncogén por primera vez en linfomas humanos. El onco-

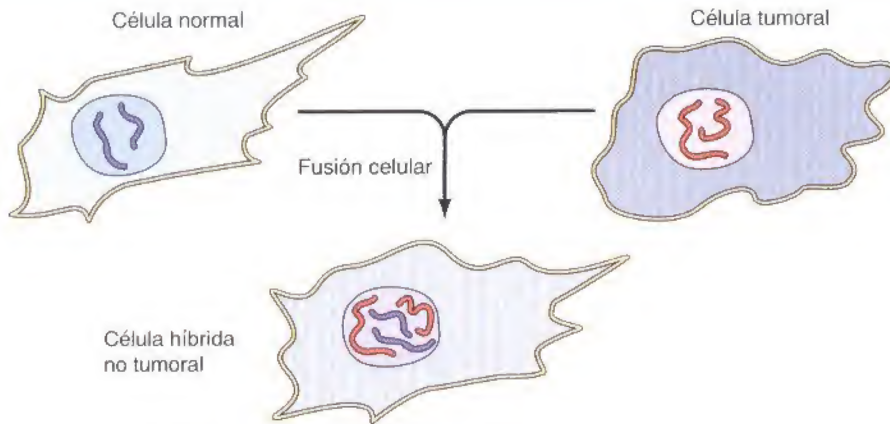



*Figura 15.32*
**Supresión de la capacidad de génesis tumoral mediante fusión celular.** La fusión de células tumorales con células sanas dio lugar a híbridos que contenían cromosomas de ambos progenitores. Estos híbridos no suelen tener capacidad de generar tumores.

gén *bcl*-2 se genera mediante una translocación cromosómica cuya consecuencia es una expresión elevada de Bcl-2, lo que bloquea la apoptosis y mantiene la supervivencia celular bajo condiciones que normalmente inducirían la muerte de la célula. La identificación de *bcl*-2 como un oncogén no sólo proporcionó la primera demostración acerca de la importancia de la muerte celular programada en el desarrollo del cáncer, sino que llevó al descubrimiento del papel que tienen Bcl-2 y otros genes relacionados como reguladores principales de la apoptosis en organismos que van desde *C. elegans* hasta el ser humano.

## Genes supresores de tumores

La activación de los oncogenes celulares sólo representa uno de los dos tipos de alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del tumor; la otra es la inactivación de los genes supresores de tumores. Los oncogenes causan la proliferación anormal de las células debido a alteraciones genéticas que incrementan la expresión génica o producen la actividad incontrolada de las proteínas codificadas por los oncogenes. Los **genes supresores de tumores** representan un mecanismo opuesto de control del crecimiento celular, normalmente inhibiendo la proliferación celular y el desarrollo del tumor. En muchos tumores, estos genes están ausentes o inactivados, por lo que no intervienen reguladores negativos de la proliferación celular, lo que contribuye a la proliferación anormal de las células tumorales.

### *Identificación de los genes supresores de tumores*

Los primeros datos acerca de la actividad de los genes supresores de tumores se obtuvieron a partir de experimentos de hibridación de células somáticas realizados por Henry Harris y col. en 1969. La fusión de células normales con células tumorales dio como resultado células híbridas, que contenían los cromosomas de ambos progenitores (Fig. 15.32). En la mayoría de los casos, estas células híbridas no eran capaces de formar tumores en animales. Por lo tanto, parecía ser que había genes procedentes del progenitor celular normal que inhibían (o suprimían) el desarrollo del tumor. Sin embargo, la caracterización de estos genes a nivel molecular vino a partir de un abordaje diferente —el análisis de formas hereditarias poco frecuentes de cáncer en humanos.

El primer gen supresor de tumores se identificó a partir de estudios del retinoblastoma, un tumor de ojos en niños poco frecuente. Siempre y cuando la enfermedad se detecte tempranamente, el retinoblastoma puede ser tratado con éxito, y muchos pacientes sobreviven teniendo descendencia. Así se llegó a la conclusión de que muchos casos de retinoblastoma son hereditarios. En estos casos, aproximadamente el 50 % de los hijos de un progenitor afectado desarrollarán el retinoblastoma, lo que concuerda con la transmisión Mendeliana de un único gen dominante que confiere susceptibilidad al desarrollo del tumor (Fig. 15.33).

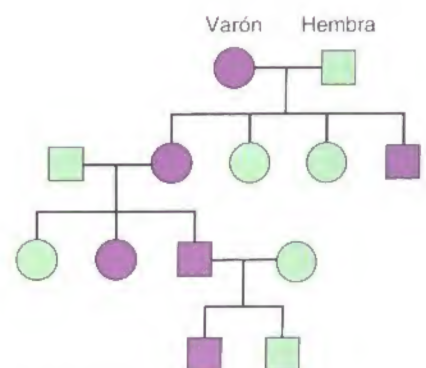



*Figura 15.33*
**Herencia del retinoblastoma.** La susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite a cerca del 50 % de la descendencia. Los símbolos morados y verdes indican los individuos afectados y sanos, respectivamente.

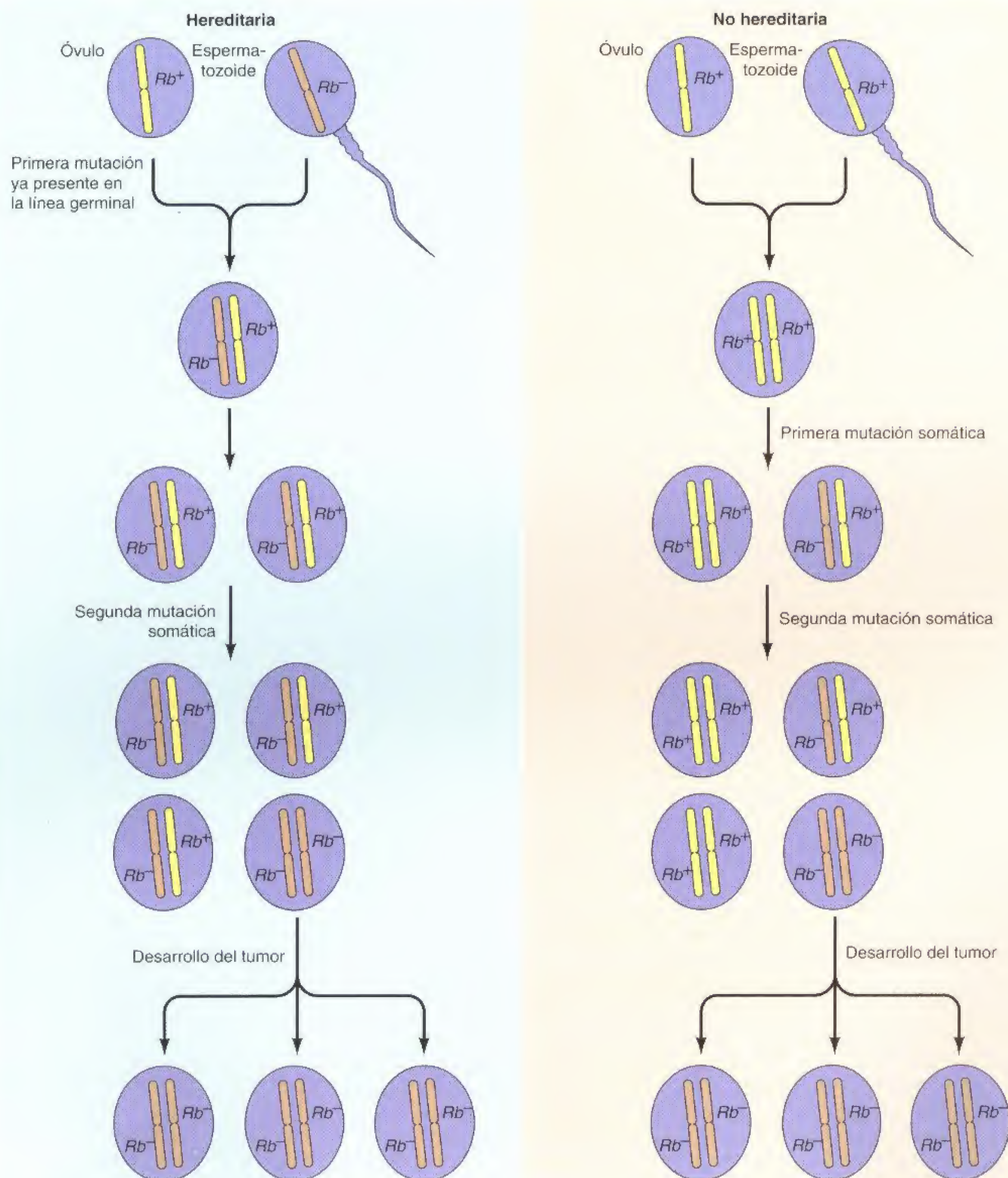



*Figura 15.34*
**Mutaciones de *Rb* durante el desarrollo del retinoblastoma.** En el retinoblastoma hereditario se hereda del progenitor afectado una copia defectuosa del gen *Rb* ($Rb^-$). Una segunda mutación somática, que inactiva la única copia sana $Rb^+$ de la célula de la retina, provoca el desarrollo del retinoblastoma. En los casos no hereditarios, se heredan dos genes $Rb^+$ normales, y sólo se desarrolla el retinoblastoma si dos mutaciones somáticas inactivan ambas copias de *Rb* en la misma célula.

Aunque la susceptibilidad de sufrir retinoblastoma se transmite como un carácter dominante, la herencia de este gen no es suficiente para transformar una célula normal de la retina en una célula tumoral. Todas las células de la retina del paciente heredarán el gen, pero sólo una pequeña parte de estas células darán lugar al tumor. Así, el desarrollo del tumor requiere otros procesos además de la herencia de la susceptibilidad al tumor. En 1971, Alfred Knudson propuso que para que se desarrolle el retinoblastoma se requieren dos mutaciones; ahora se sabe que éstas corresponden a la pérdida de las dos copias funcionales del gen (el gen supresor de tumores ***Rb***) presente en los cromosomas homólogos de una célula diploide normal (Fig. 15.34). En el retinoblastoma hereditario, una copia defectuosa de *Rb* se transmite genéticamente. La pérdida de esta única copia de *Rb* no es suficiente por sí misma para que se produzca el desarrollo del tumor, pero en estos individuos se suele desarrollar el retinoblastoma debido a una segunda mutación somática que produce la pérdida del alelo *Rb* normal. Por el contrario, el retinoblastoma no hereditario es muy poco frecuente, ya que para que se desarrolle se requieren dos mutaciones somáticas independientes para inactivar ambas copias del *Rb* normal de la misma célula.

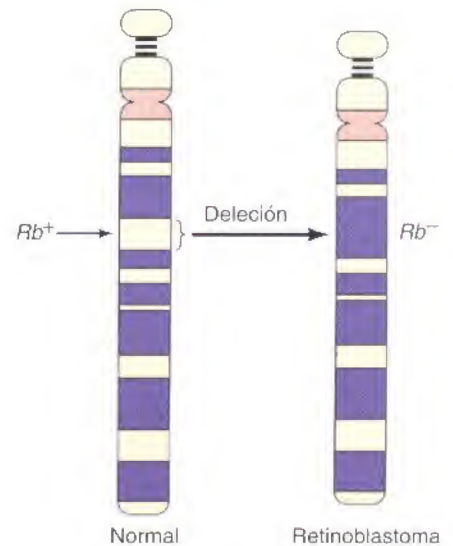



*Figura 15.35*
**Deleciones de Rb en el retinoblastoma.** Muchos retinoblastomas tienen deleciones en el *locus* cromosómico (13q14) donde se localiza el gen *Rb*.

La función del gen *Rb* como un regulador negativo del desarrollo de tumores se dedujo inicialmente a partir de las observaciones de la morfología de los cromosomas. En algunos retinoblastomas se encontraron deleciones visibles del cromosoma 13q14, lo que sugería que era la pérdida del gen *Rb* (en vez de su activación) lo que producía el desarrollo del tumor (Fig. 15.35). Posteriormente, estudios de mapeo genético indicaron que el desarrollo del tumor se debía a la pérdida de los alelos *Rb* normales en las células tumorales, lo que estaba de acuerdo con la función de *Rb* como un gen supresor de tumores. El clonaje de *Rb* en 1986 estableció de manera definitiva que en los retinoblastomas *Rb* se ha perdido o ha mutado. Los experimentos de transferencia génica también demostraron que si se introducía un gen *Rb* normal en células de retinoblastoma revertía su capacidad tumoral, lo que era una evidencia directa de la actividad de *Rb* como supresor de tumores.

Aunque *Rb* se identificó en un cáncer infantil poco común, también interviene en algunos de los tumores más comunes de los adultos. Concretamente, a partir de los estudios del gen clonado se ha establecido que *Rb* falta o es inactivo en muchos carcinomas de vejiga, mama y pulmón. Por lo tanto, la importancia del gen supresor de tumores *Rb* trasciende al retinoblastoma, ya que parece ser que contribuye al desarrollo de una parte importante de los cánceres humanos más comunes. Además, como se mencionó anteriormente en este Capítulo, la proteína Rb es una diana importante de las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN, incluyendo al SV40, al adenovirus, al papilomavirus humano, y herpesvirus asociados al sarcoma de Kaposi, que se unen a Rb e inhiben su actividad (Fig. 15.36). Por lo tanto, la transformación por estos virus se debe, al menos en parte, a la inactivación de Rb a nivel de proteínas, en vez de a una mutación que cause la inactivación del gen *Rb*.

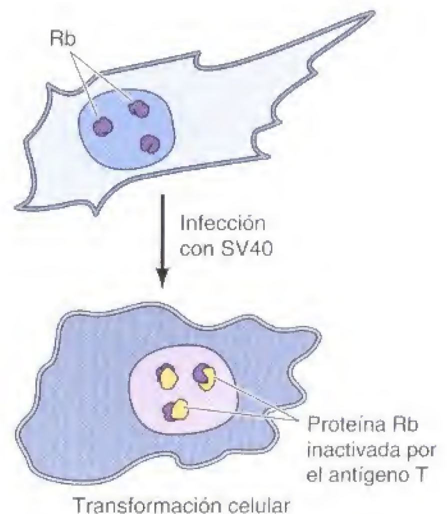



*Figura 15.36*
**Interacción de Rb con proteínas oncogénicas de virus tumorales de ADN.** Las proteínas oncogénicas de varios virus tumorales de ADN (p. ej., el antígeno T de SV40) inducen la transformación mediante la unión y la inactivación de la proteína Rb.

La caracterización de *Rb* como un gen supresor de tumores sirvió como modelo para identificar otros genes supresores de tumores que contribuyen al desarrollo de muchos cánceres humanos diferentes (Tabla 15.5). Algunos de estos genes se identificaron como las causas de cánceres hereditarios poco frecuentes, desempeñando un papel similar al que desempeña *Rb* en el retinoblastoma hereditario. Otros genes supresores de tumores se han identificado como genes que con frecuencia faltan o están mutados en cánceres adultos comunes no hereditarios, como es el caso del carcinoma de colon. En cualquier caso, parece ser que la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen en el desarrollo de tipos de cáncer hereditarios y no hereditarios. Así, la mutación de algunos genes supresores de tumores parece ser la alteración molecular más común responsable del desarrollo de un tumor humano.

El siguiente gen supresor de tumores identificado fue *p53*, que suele encontrarse inactivado en una gran variedad de cánceres humanos, incluyendo leucemias,

**TABLA 15.5.** Genes supresores de tumores

| Gen | Tipo de cáncer |
|---|---|
| *APC* | Carcinoma de colon/recto |
| *BRCA1* | Carcinomas de mama y ovario |
| *BRCA2* | Carcinoma de mama |
| *INK4* | Melanoma, carcinoma de pulmón, tumores cerebrales, leucemias, linfomas |
| *NF1* | Neurofibrosarcoma |
| *NF2* | Meningioma |
| *p53* | Tumores cerebrales; carcinomas de mama, de colon/recto, de esófago, hepático y de pulmón; leucemias y linfomas |
| *PTC* | Carcinoma de las células basales |
| *PTEN* | Tumores cerebrales; melanoma; carcinomas de próstata, endometrio, riñón y pulmón |
| *Rb* | Retinoblastoma; sarcomas; carcinomas de vejiga, mama y pulmón |
| *Smad2* | Carcinoma de colon/recto |
| *Smad4* | Carcinoma de colon/recto, carcinoma pancreático |
| *TβRII* | Carcinoma de colon/recto, carcinoma gástrico |
| *VHL* | Carcinoma de las células renales |
| *WT1* | Tumor de Wilms |

linfomas, sarcomas, tumores cerebrales, y carcinomas de diversos tejidos, como los de mama, colon y pulmón. En total las mutaciones de *p53* intervienen en el 50% de los cánceres, lo que hace de él la diana susceptible de alteraciones genéticas más frecuente en los cánceres humanos. También hay que destacar que las mutaciones hereditarias de *p53* son las responsables de la transmisión genética de un síndrome canceroso hereditario poco frecuente, en el que los individuos afectados desarrollan cualquier tipo de cáncer. Además, la proteína p53 (al igual que Rb) es una diana para las proteínas oncogénicas del SV40, adenovirus, y papilomavirus humano, y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi.

Al igual que *p53*, los genes supresores de tumores *INK4 y PTEN* se encuentran frecuentemente mutados en cánceres comunes, incluyendo el cáncer de pulmón, de próstata y el melanoma. Otros genes supresores de tumores (incluyendo *APC, TβII, Smad2* y *Smad4*) a menudo se encuentran inactivados en los cánceres de colon. Además de estar implicados en casos no hereditarios de cáncer común en adultos, las mutaciones hereditarias del gen *APC* son responsables de una forma infrecuente hereditaria de cáncer de colon, denominada poliposis adenomatosa familiar. Los individuos que padecen esta condición desarrollan cientos de adenomas benignos en el clon (pólipos), algunos de los cuales inevitablemente progresan hacia la malignidad. Las mutaciones heredadas de otros dos genes supresores de tumores, *BRCA1* y *BRCA2*, son responsables de los casos hereditarios de cáncer de mama, que constituyen del 5 al 10% del total de la incidencia del cáncer de mama. Algunos genes supresores de tumores adicionales se han implicado en el desarrollo de tumores cerebrales, cánceres pancreáticos y carcinomas de células basales de la piel, además de en diversos síndromes de cáncer hereditarios infrecuentes, como el tumor de Wilms.

### *Funciones de los productos de los genes supresores de tumores*

A diferencia de las proteínas oncogénicas y proto-oncogénicas, las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores inhiben la proliferación o la supervivencia de la célula. Por lo tanto, la inactivación de los genes supresores de tumores conduce al desarrollo del tumor eliminando proteínas de regulación negativa. En varios casos las proteínas supresoras de tumores inhiben las mismas vías reguladoras que se activan por los productos de los oncogenes.

Un ejemplo interesante del antagonismo entre los productos oncogénicos y los productos de los genes supresores de tumores es la proteína codificada por el gen supresor de tumores ***PTEN*** (Fig. 15.37). La proteína PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila la posición 3 de los fosfatidilinosítidos, como el fosfatidilinositol 3, 4, 5-bifosfato ($PIP_3$). Mediante la desfosforilación de $PIP_3$, PTEN ejerce el efecto contrario al de la PI3-quinasa y Akt, que actúan como oncogenes al promover la supervivencia celular. Por el contrario, la inactivación o pérdida de la proteína supresora de tumores PTEN puede contribuir al desarrollo del tumor debido a que en tal caso aumentarán los niveles de $PIP_3$, se activará Akt, y se inhibirá la muerte celular programada.

Las proteínas codificadas por los oncogenes y por los genes supresores de tumores también intervienen en la vía de señalización de Hedgehog (véase Fig. 13.45). El receptor Smoothened es un oncogén en los carcinomas de célu-

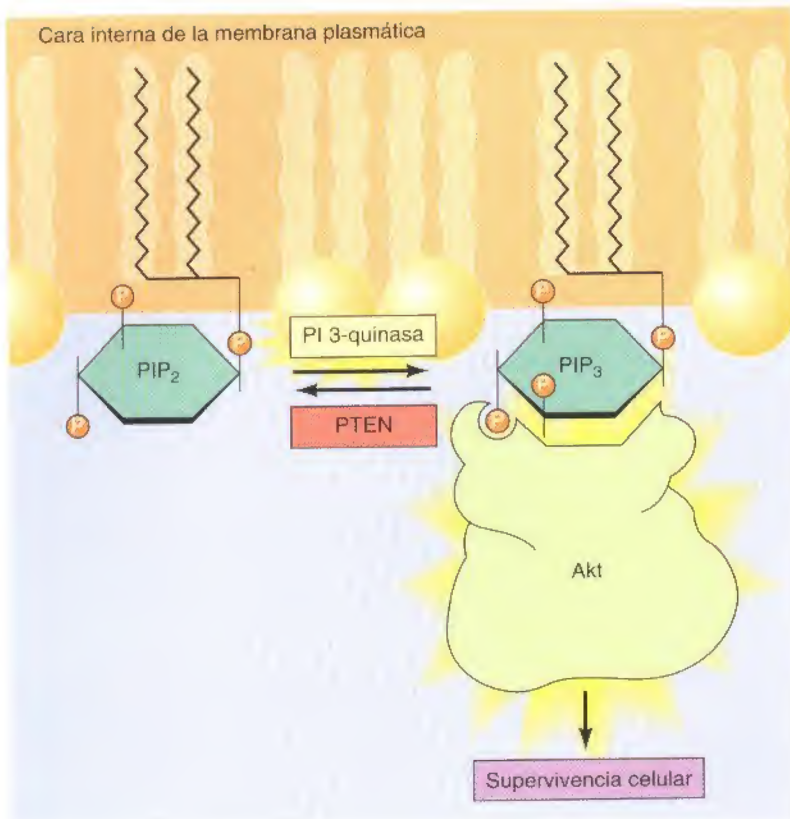



*Figura 15.37*
**Supresión de la supervivencia celular por PTEN.** La proteína supresora de tumores PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila $PIP_3$ en la posición 3 del inositol, dando lugar a $PIP_2$. Así, PTEN contrarresta la actividad de los oncogenes PI 3-quinasa y Akt que promueven la supervivencia celular.

las basales, mientras que Patched (el regulador negativo de Smoothened) es un gen supresor de tumores. Además, las proteínas Gli (los homólogos en mamíferos del factor de transcripción Ci de *Drosophila*, activado por Smoothened) fueron identificadas por primera vez como los productos de un oncogén amplificado.

Varios genes supresores de tumores codifican proteínas reguladoras de la transcripción. Un ejemplo de esto es el producto de *WT1*, que se encuentra inactivo en los tumores de Wilms (un tumor de riñón infantil). La proteína WT1 es un represor que parece ser que suprime la transcripción de una serie de genes inducibles por factores de crecimiento. Se cree que una de las dianas de WT1 es el gen que codifica el factor de crecimiento II análogo a la insulina, que se sobreexpresa en los tumores de Wilms y puede que contribuya al desarrollo del tumor actuando como un factor de crecimiento autocrino. Por lo tanto, la inactivación de WT1 provocaría la expresión alterada de un factor de crecimiento, lo que a su vez causaría la proliferación de las células tumorales. Otros dos genes supresores de tumores, *Smad2* y *Smad4*, codifican factores de transcripción que se activan por la señalización de TGF-$\beta$ y desencadenan la inhibición de la proliferación celular. Consistente con la actividad de la vía del TGF-$\beta$ en la inhibición de la proliferación celular, el receptor de TGF-$\beta$ también está codificado por un gen supresor de tumores (*T$\beta$RII*).

Los productos de los genes supresores de tumores *Rb* e *INK4* regulan la progresión del ciclo celular en el mismo lugar en el que lo hace la ciclina D1 (Fig. 15.38). Rb inhibe el paso a través del punto de restricción en $G_1$, reprimiendo la transcripción de determinados genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la síntesis del ADN (véase Fig. 14.20). En las células normales el paso a través de este punto de restricción se regula por los complejos Cdk4/ciclina D, que fosforilan e inactivan a Rb. Por lo tanto, la inactivación de *Rb* en los tumores debido a su mutación supone la pérdida de un regulador negativo de la progresión del ciclo celular. El gen supresor de tumores *INK4*, que codifica al inhibidor p16 de

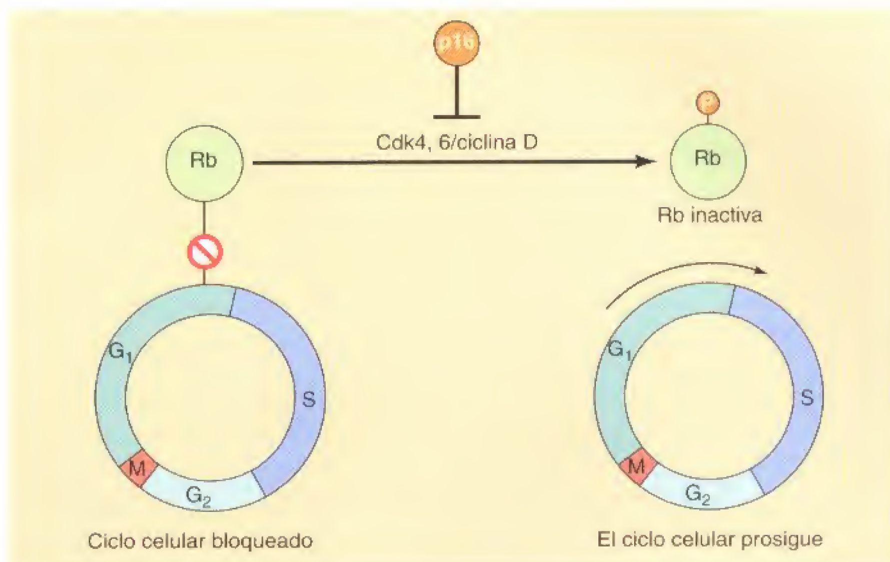



*Figura 15.38*
**Inhibición de la progresión del ciclo celular por Rb y p16.** Rb inhibe la progresión a través del punto de restricción en $G_1$. Los complejos Cdk4,6/ciclina D promueven el paso a través del punto de restricción mediante la fosforilación e inactivación de Rb. p16 inhibe la actividad de Cdk4, 6/ciclina D.

Cdk, también regula el paso a través del punto de restricción. Como ya se trató en el Capítulo 14, p16 inhibe la actividad de Cdk4,6/ciclina D. Por lo tanto, la inactivación de *INK4* tiene como consecuencia el aumento de la actividad de los complejos Cdk4/ciclina D, lo que da lugar a una fosforilación incontrolada de Rb.

El producto del gen *p53* regula la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Fig. 15.39). La lesión del ADN induce rápidamente a p53 que activa la transcripción del inhibidor p21 de Cdk (véase Fig. 14.21). El inhibidor p21 bloquea la progresión del ciclo celular actuando como un inhibidor general de los complejos Cdk/ciclina e inhibiendo la replicación del ADN mediante su unión al PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). La consecuencia de que el ciclo celular se detenga es que así se proporciona tiempo suficiente para que se repare el ADN lesionado antes de su replicación. La ausencia de p53 impide que se detenga el ciclo celular, lo que conduce a que la tasa de mutación aumente y a la inestabilidad del genoma de la célula. Esta inestabilidad genética es una característica común de las células cancerosas, y puede contribuir a que se produzcan posteriores alteraciones de los oncogenes y de los genes supresores de tumores durante la progresión del tumor. A pesar de que su función todavía no se conoce por completo, los productos de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que son responsables de algunos cánceres hereditarios de mama y ovario, también parecen estar implicados en los puntos de control de la progresión del ciclo celular.

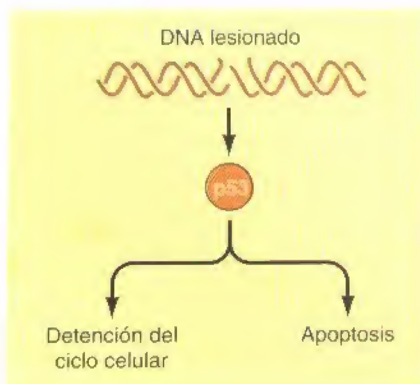



*Figura 15.39*
**Acción de p53.** La p53 salvaje (*wild-type*) se requiere para que el ciclo celular se detenga y para la apoptosis inducida por lesión del ADN.

Además de detener el ciclo celular, p53 se requiere para la apoptosis inducida por lesión del ADN. Los efectos de p53 sobre la apoptosis están mediados por la activación de la transcripción de un miembro de la familia Bcl-2 (PUMA) que induce la muerte celular. El ADN dañado y no reparado suele inducir la apoptosis de las células de mamífero, lo cual es una respuesta beneficiosa para el organismo puesto que así se eliminan las células que porten mutaciones perjudiciales (p.e. células que puedan convertirse en células cancerosas). Las células que carecen de p53 son incapaces de sufrir la apoptosis en respuesta a los agentes que dañan el ADN, incluyendo la radiación y muchas de las drogas utilizadas como quimioterapia contra el cáncer. Esta incapacidad de sufrir la apoptosis en respuesta a las lesiones en el ADN es una de las causas de la resistencia que ofrecen los tumores a la quimioterapia. Además, la ausencia de p53 parece que interfiere con la apoptosis inducida por otros estímulos, como son la privación de factores de crecimiento y de oxígeno. Se considera que estos efectos de la inactivación de p53 dan cuenta de la elevada tasa de mutaciones en p53 en los tumores humanos.

### *Papel de los oncogenes y de los genes supresores de tumores en el desarrollo del tumor*

Como ya se trató anteriormente, el desarrollo del cáncer es un proceso multietapa en el que las células sanas progresan de manera gradual hasta convertirse en células cancerosas. La secuencia completa de los procesos que se requieren para el desarrollo de cualquier cáncer humano todavía no se conoce, pero está claro que tanto la activación de los oncogenes como la inactivación de los genes supresores de tumores son pasos críticos en la iniciación y progresión del tumor. A la larga, el daño acumulado en varios genes es el responsable del aumento de la capacidad de proliferar, de invadir otros tejidos y de generar metástasis, característico de las células cancerosas.

Donde mejor se comprende el papel que desempeñan las múltiples alteraciones genéticas es en el caso de los carcinomas de colon, que han sido estudiados intensamente por Bert Vogelstein y col. En estos tumores se suele producir la mutación de los oncogenes *ras*K y la inactivación o deleción de tres genes supresores de tumores diferentes —*APC*, *MADR2*, y *p53*. Puesto que mediante extirpación quirúrgica se pueden obtener muestras representativas de los diferentes estadios del desarrollo del cáncer de colon, ha sido posible relacionar las alteraciones genéticas con las etapas diferenciadas de la progresión del tumor (Fig. 15.40).

Estos estudios indican que un suceso temprano en el desarrollo del tumor es la inactivación de *APC* (un componente de la vía de señalización del Wnt; véase Fig. 13.46). La transmisión hereditaria de genes *APC* mutados en pacientes con poliposis adenomatosa familiar tiene como consecuencia una proliferación anormal de las células del colon, lo que conduce al desarrollo de múltiples adenomas en el colon de los pacientes afectados. Las mutaciones en *APC* también se encuentran con frecuencia en pacientes con carcinomas de colon no hereditarios y se detectan en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad. En algunos casos, la activación de la señalización a través de Wnt resulta de las mutaciones presentes en el gen que codifica la β-catenina (que se encuentra por debajo de APC en la vía de señalización de Wnt), en lugar de mutaciones en *APC*.

Las mutaciones de los genes *ras*K son las siguientes en aparecer, y los oncogenes *ras*K están presentes con frecuencia en los adenomas de colon. Algunos tumores de colon poseen mutaciones que dan lugar a la activación de un miembro de la familia de oncogenes *raf* (B-*raf*), en lugar de mutaciones de *ras*K. Puesto que Raf está inmediatamente debajo de Ras, la activación de uno de los oncogenes *ras*K o B-*raf*, desencadena la estimulación de la señalización mediada por ERK en las células tumorales.

Prácticamente todos los cánceres de colon poseen mutaciones que afectan a la vía de señalización de TGF-β, que inhibe la proliferación celular induciendo la síntesis de p15, un miembro de la familia Ink4 de inhibidores de Cdk. Las mutaciones que afectan a la señalización de TGF-β también parecen tener lugar relativamente temprano en el desarrollo de los cánceres de colon, y se encuentran con frecuencia en los adenomas. En algunos tumores, las mutaciones inactivan al gen supresor de tumores *TβRII*, que codifica al receptor de TGF-β. En otros casos, las mutaciones inactivan a los genes supresores de tumores que codifican los factores de transcripción Smad2 o Smad4, que son las dianas de la señalización de TGF-β. Finalmente, el gen supresor de tumores *p53* es inactivado, generalmente en un estadio más avanzado del desarrollo del tumor.

La acumulación de daños en múltiples oncogenes y genes supresores de tumores que afectan a distintas vías que regulan la proliferación y supervivencia celular parece ser la responsable del desarrollo en múltiples etapas del cáncer de colon. La acumulación de daños tanto a oncogenes como a genes supresores de tumores parece ser, del mismo modo, responsable del desarrollo de otros tipos de cáncer, incluidos los carcinomas de mama y de pulmón. La pérdi-

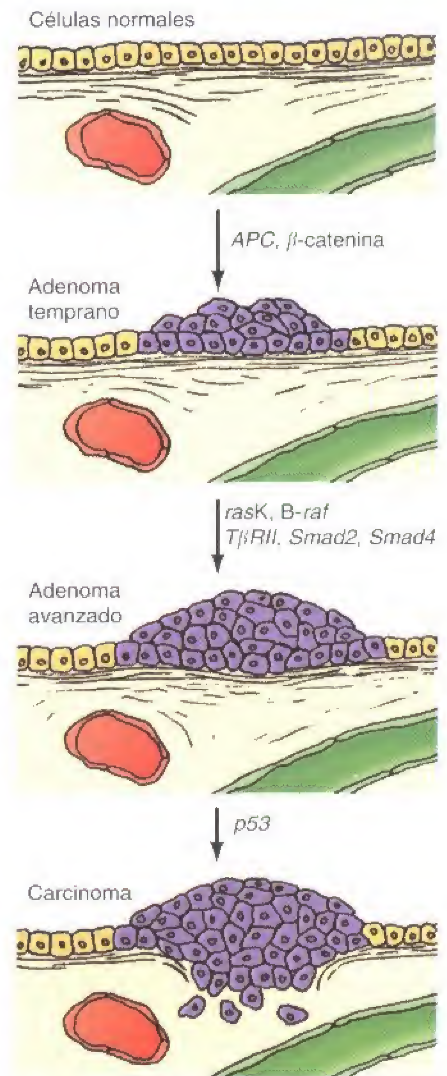



*Figura 15.40*
**Alteraciones genéticas en los carcinomas de colon.** La inactivación de *APC* (un componente de la vía de señalización del Wnt) ocurre en una fase temprana del desarrollo del tumor, dando lugar a una población celular proliferativa. En ciertos casos en lugar de esto se producen mutaciones en el gen que codifica la β-catenina (que se encuentra por debajo de APC en la vía de señalizaciónde Wnt). Entonces el desarrollo de adenomas está relacionado con mutaciones en los genes *ras* o *raf* (que estimula la señalización mediada por ERK) y con gene que codifican los componentes de la vía TGF-β (el receptor de TGF-β, Smad2 o Smad4). Mutaciones posteriores de *MADR2* y de *p53* se asocian a estadios más avanzados de la progresión tumoral.

da progresiva del control del crecimiento que es característico de las células cancerosas se cree que es pues, el resultado final de las anomalías en los productos de múltiples genes que en condiciones normales regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

## Aplicaciones de la biología molecular para la prevención y tratamiento del cáncer

Se ha aprendido mucho acerca de los defectos moleculares responsables del desarrollo de muchos cánceres humanos. Sin embargo, el cáncer es algo más que un tema de interés científico. Es una enfermedad terrible que causa la muerte de cerca de uno de cada cuatro americanos. Por lo tanto, aplicar nuestro conocimiento del cáncer para mejorar la prevención y el tratamiento del mismo representa un reto fundamental en la investigación actual y futura. Afortunadamente, los avances en la caracterización de la biología molecular del cáncer comienzan a contribuir al desarrollo de nuevos abordajes en su prevención y tratamiento, lo que en último término permitirá hacer frente a la enfermedad de una manera más adecuada.

### *Prevención y detección precoz*

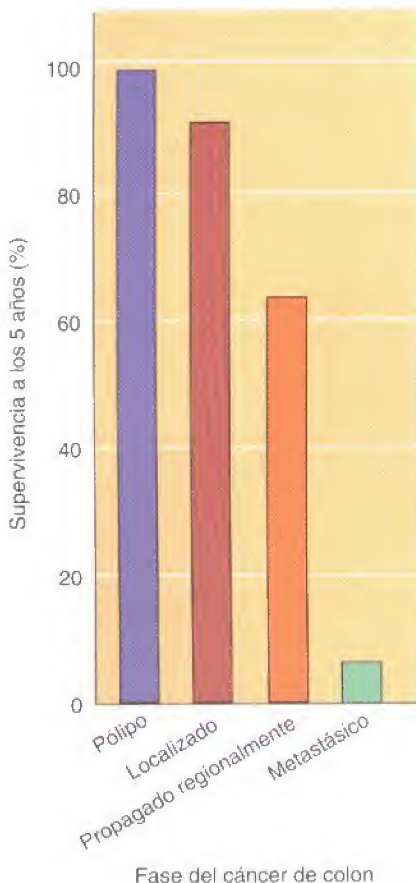



*Figura 15.41*
**Tasas de supervivencia de pacientes con carcinoma de colon.** Se muestran las tasas de supervivencia durante cinco años de pacientes a los que se les diagnosticó adenomas (pólipos), carcinomas localizados en su lugar de origen, carcinomas que se habían propagado a tejidos adyacentes y nódulos linfáticos, y carcinoma metastásico.

La manera más efectiva de hacer frente al cáncer sería evitar el desarrollo de la enfermedad. La segunda mejor manera, pero también efectiva, sería detectar de manera fiable el tumor antes de que alcanzara la etapa de carácter maligno, de tal manera que pudiera ser tratado. Muchos cánceres se pueden curar mediante tratamientos locales, como la cirugía o la irradiación, siempre y cuando se detecten antes de que se propaguen por metástasis por todo el cuerpo. Por ejemplo, las etapas premalignas del cáncer de colon (adenomas) se suelen curar por completo mediante procedimientos quirúrgicos menores (Fig. 15.41). La tasa de curación de los carcinomas tempranos que todavía permanecen en su lugar de origen también es elevada, cerca del 90 %. Sin embargo, la tasa de supervivencia disminuye a cerca del 50 % para aquellos pacientes cuyo cáncer se ha difundido a los tejidos adyacentes y a los nódulos linfáticos, y es menor del 10 % para aquellos pacientes con cáncer de colon metastásico. Por lo tanto, la detección precoz del cáncer es un factor determinante en las consecuencias de la enfermedad.

La principal aplicación de la biología molecular a la prevención y a la detección precoz consiste en identificar a aquellos individuos que tienen una tendencia hereditaria a desarrollar el cáncer. Esta tendencia hereditaria se debe a mutaciones en los genes supresores de tumores, en al menos algún oncogén (*ret*), así como en los genes de reparación del ADN, como por ejemplo en los genes reparadores de bases desapareadas; esta última mutación es la responsable del cáncer de colon no polipoide hereditario (véase medicina molecular en el Cap. 5). Las mutaciones en estos genes se pueden detectar mediante una prueba genética, lo que permite identificar a los individuos de alto riesgo antes de que la enfermedad se desarrolle.

Además de contribuir a la toma de decisiones en el ámbito de la planificación familiar, el seguimiento riguroso de aquellos individuos de alto riesgo permitirá la detección precoz y un tratamiento más efectivo de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, los adenomas de colon se pueden detectar por colonoscopia y se pueden extirpar antes de que se conviertan en tumores malignos. Los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (debido a mutaciones hereditarias en el gen supresor de tumores *APC*) suelen desarrollar cientos de adenomas en sus primeros 20 años de vida, por lo que el colon de estos pacientes se suele extirpar antes de que alguno de estos pólipos progrese hasta un estado de tumor maligno. Sin embargo, los pacientes con cáncer de colon no polipoide hereditario desarrollan un menor número de pólipos en momentos posteriores de la vida, por lo que se pueden beneficiar de la colonoscopia rutinaria y de determinadas drogas, como por ejemplo las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), que inhiben el desarrollo del cáncer de colon.

La herencia de cánceres debidos a alteraciones en genes conocidos es un hecho poco frecuente, constituyendo cerca del 5 % de la incidencia total del cáncer. El tipo de cáncer con una tendencia hereditaria más común es el cáncer de colon no polipoide hereditario, que contabiliza cerca del 15 % de los cánceres de colon y del 1 al 2 % de todos los cánceres en los Estados Unidos. Las mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* también son bastante comunes, y contabilizan del 5 al 10 % de todos los cánceres de mama. Sin embargo, algunos genes que favorecen la tendencia a contraer el cáncer, que aún no han sido identificados, pueden incrementar el número de tumores malignos comunes de adultos, como los cánceres de mama, de colon y de pulmón. Por lo tanto, la caracterización de aquellos genes que favorecen la tendencia a tener cáncer es una empresa importante con unas implicaciones prácticas evidentes. A los individuos con estos genes se les aconsejaría que evitaran su exposición a carcinógenos importantes (p. ej., el humo del tabaco en el caso del cáncer de pulmón) y se les realizaría un seguimiento riguroso para detectar los tumores en etapas tempranas, de tal manera que pudieran ser tratados más fácilmente. La identificación fehaciente de los individuos susceptibles, seguida de unas medidas de detección y preventivas adecuadas, podrían en último término disminuir de manera importante la mortalidad por cáncer.

## Diagnóstico molecular

El análisis molecular de los oncogenes y de los genes supresores de tumores implicados en determinados tipos de tumores puede proporcionar información útil para el diagnóstico del cáncer y para el seguimiento de los efectos del tratamiento. Así, ya se están poniendo en práctica varias aplicaciones de este tipo de diagnóstico molecular. En algunos casos, las mutaciones de los oncogenes han proporcionado marcadores moleculares útiles para seguir el curso de la enfermedad durante su tratamiento. Un buen ejemplo es la translocación de *abl* en la leucemia mielogénica crónica. Como ya se trató anteriormente, esta translocación provoca la fusión de *abl* con el gen *bcr*, lo que produce la expresión de la proteína oncogénica Bcr/Abl (véase Fig. 15.25). A través del método de la reacción en cadena de la polimerasa (véase Fig. 3.27) se puede detectar el oncogén *bcr/abl* recombinante en las células leucémicas, por lo que se utiliza para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento.

En otros casos, la detección de mutaciones en determinados oncogenes o en genes supresores de tumores proporciona información acerca de qué opciones terapéuticas elegir. Por ejemplo, el que se hayan amplificado N-*myc* en los neuroblastomas y *erb*B-2 en los carcinomas de mama y de ovario permite predecir una progresión rápida de la enfermedad. Por lo tanto, los pacientes con estos oncogenes amplificados deberían recibir un tratamiento más agresivo.

Además del análisis de genes individuales, puede obtenerse información diagnóstica importante a partir del análisis global de la expresión génica en los cánceres. El uso de *microarrays* de ADN permite analizar simultáneamente la expresión de decenas de miles de genes (ver Figura 3.27), de modo que es posible desarrollar una clasificación molecular de los cánceres mediante la comparación de los perfiles de expresión génica de los diferentes tumores. Estudios de este tipo sugieren que los análisis de perfiles de expresión génica pueden distinguir entre tumores que de otro modo resultan similares, y proporciona información que predice el resultado clínico y la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, el análisis de la expresión génica se ha utilizado para diferenciar dos tipos de linfomas grandes y difusos de células B, que difieren significativamente en su respuesta a las terapias actuales. Aproximadamente el 40% de los pacientes con linfomas grandes y difusos de células B responden bien al tratamiento, mientras que el resto poseen un mal pronóstico. El análisis de la expresión génica demostró que una serie de linfomas grandes y difusos de células B podía dividirse en dos grupos diferentes, con perfiles de expresión que se asemejan a diferentes etapas del desarrollo normal de las células B (Figura 15.42). Curiosamente, los pacientes con linfomas caracterizados por perfiles de expresión génica que se

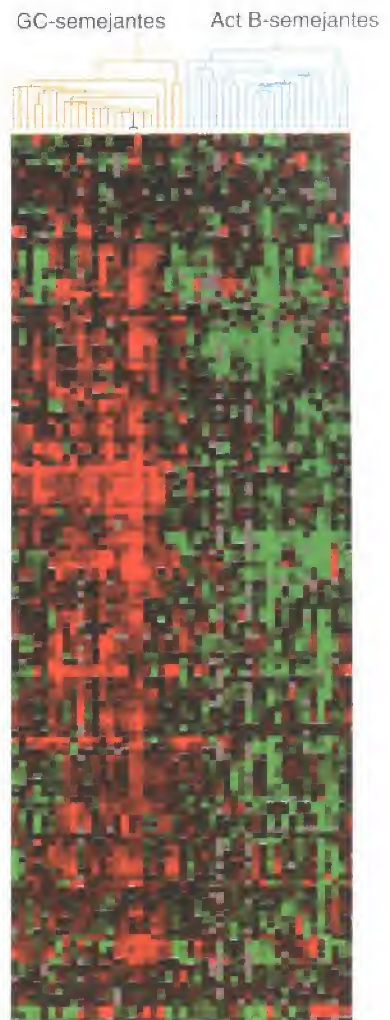



*Figura 15.42*
**Perfil de la expresión génica de linfomas grandes y difusos de células B.** Una serie de linfomas grandes y difusos de células B fueron divididos en 2 subtipos, denominados semejantes a células B de los centros germinales (GC-semejantes, naranja) y semejantes a células B activadas (Act B-semejantes, azul), basándose en los perfiles de expresión génica. Las sondas fluorescentes de los linfomas individuales fueron hibridadas con una serie de clones de ADNc sobre el *microarray*. Cada fila representa un clon aislado de ADNc y cada columna representa una sonda fluorescente preparada a partir de una muestra aislada de ARNm de linfoma. Los resultados ilustran la hibridación de sondas fluorescentes de linfoma relativas a una sonda referencia, donde la fluorescencia roja corresponde a una hibridación más intensa por parte de la sonda de linfoma. Los linfomas semejantes a células B de los centros germinales corresponden a un estadío más temprano del desarrollo de las células B. (De A. Alizadeh et al., 2000. *Nature* 403: 503.)

asemejan a un estadío temprano del desarrollo de las células B tenían una tasa de supervivencia marcadamente superior, demostrando el valor pronóstico de clasificar estos linfomas según sus patrones de expresión génica. Aplicaciones similares del análisis de la expresión génica en otros tipos de cáncer, incluyendo los carcinomas de mama, pulmón y próstata, empiezan a generar información valiosa con respecto a los subtipos de tumores y su comportamiento clínico.

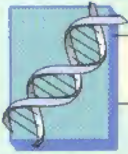
### *Tratamiento*

Sin embargo, la cuestión fundamental es saber si el descubrimiento de los oncogenes y de los genes supresores de tumores dará lugar al desarrollo de nuevos medicamentos que actúen selectivamente contra las células cancerosas. La mayoría de los medicamentos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer, bien dañan el ADN, o bien inhiben la replicación del ADN. Por lo tanto, estos medicamentos no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células sanas, especialmente para aquellas células sanas que experimentan una división celular rápida (p. ej., células hematopoyéticas, células epiteliales del tracto gastrointestinal, y células del folículo piloso). La acción de los medicamentos anticancerosos contra estas poblaciones de células sanas es la responsable de la mayor parte de la toxicidad asociada a estos medicamentos, y limita su efectividad en el tratamiento del cáncer.

Un nuevo abordaje prometedor a la terapia del cáncer es la utilización de drogas que inhiben el crecimiento del tumor interfiriendo con la angiogénesis (la formación de los vasos sanguíneos), en vez de actuar directamente contra las células cancerosas. Como ya se mencionó anteriormente en este Cap., se necesita que se formen nuevos vasos sanguíneos para suministrar el oxígeno y los nutrientes que se requieren para el crecimiento del tumor. Por lo tanto, para el desarrollo del tumor es fundamental promover la angiogénesis, y las células tumorales secretan determinados factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células endoteliales de los capilares, lo que origina el crecimiento de nuevos capilares en el tumor. La importancia de la angiogénesis la reconoció por primera vez Judah Folkman en 1971, y las investigaciones llevadas a cabo por Folkman y col. han conducido al desarrollo de nuevos medicamentos (endostatina y angiostatina) que inhiben la angiogénesis bloqueando la proliferación de las células endoteliales. Puesto que estos medicamentos actúan de manera específica inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, son mucho menos tóxicos para las células sanas que los agentes anticancerosos estándar. Los inhibidores de la angiogénesis han dado resultados muy prometedores en pruebas llevadas a cabo con animales, y actualmente están siendo sometidos a ensayos clínicos para evaluar su efectividad contra los cánceres humanos.

Una estrategia alternativa para conseguir un tratamiento más selectivo del cáncer consiste en desarrollar drogas dirigidas específicamente contra los oncogenes que producen el crecimiento del tumor. Desgraciadamente, desde el punto de vista del tratamiento del cáncer, los oncogenes no son exclusivos de las células tumorales. Puesto que los proto-oncogenes desempeñan un papel importante en las células sanas, es probable que los inhibidores generales de la función o de la expresión de los oncogenes actúen contra las células sanas así como contra las células tumorales. Por lo tanto, la utilidad de los oncogenes como dianas de las drogas anticancerosas no resulta evidente, pero algunos avances prometedores indican que puede ser posible desarrollar terapias selectivas basadas en los oncogenes.

El primer régimen terapéutico dirigido contra un oncogén específico se utiliza para tratar la leucemia promielocítica aguda. Esta leucemia se caracteriza por una translocación cromosómica en la que el gen que codifica el receptor del ácido retinoico (*RARα*) se une a otro gen (*PML*) para dar lugar al oncogén *PML/RARα*. Se considera que la función de la proteína PML/RARα es, al menos en parte, bloquear la diferenciación celular. Sin embargo, estas células leucémicas se diferencian en respuesta al tratamiento con dosis altas de ácido retinoico, que parece



Medicina molecular

## *STI-571: Tratamiento del cáncer dirigido contra el oncogén* bcr/abl

### La enfermedad

La leucemia mieloide crónica (LMC) constituye aproximadamente el 20% de las leucemias en adultos. En el año 2003, se estima que se diagnosticarán unos 4.300 casos de LMC en Estados Unidos, y que habrá unas 1.700 muertes causadas por esta enfermedad.

La LMC se origina a partir de una célula madre pluripotencial en la médula ósea. Es una enfermedad de desarrollo lento, que se divide clínicamente en dos etapas: la fase crónica y la crisis blástica. La fase crónica de la LMC puede persistir durante años y se asocia con una sintomatología mínima. Finalmente, sin embargo, los pacientes progresan hacia un estado agudo de la enfermedad que pone en peligro su vida, conocido como crisis blástica. La crisis blástica se caracteriza por la acumulación de grandes números de células leucémicas que proliferan rápidamente, denominadas blastos. Los pacientes que sufren la crisis blástica se tratan con drogas quimioterapéuticas estándar, que pueden inducir una remisión a la fase crónica de la enfermedad. La quimioterapia también puede utilizarse durante la fase crónica de la LMC, pero generalmente no consigue eliminar las células leucémicas. La LMC también puede tratarse mediante un trasplante de células madre de la médula ósea, lo que puede resultar curativo en aproximadamente la mitad de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad.

### Base molecular y celular

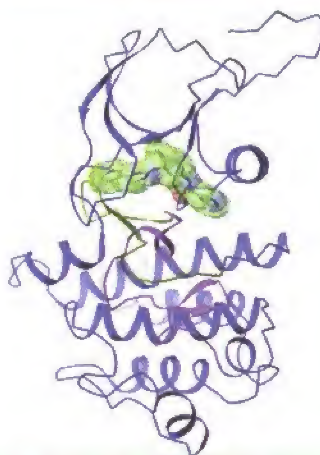
La activación del oncogén *abl* por la translocación desde su locus normal en el cromosoma 9 al cromosoma 22, es un suceso altamente reproducible en la LMC, ocurriendo en el 95% de estas leucemias. Esta translocación resulta en la formación de una fusión entre el gen *abl* y el gen *bcr* del cromosoma 22, dando lugar al oncogén *bcr/abl*. El oncogén expresa una proteína de fusión Bcr/Abl en la que la secuencia de aminoácidos Bcr sustituye al primer exón de Abl (ver Figura 15.25). La proteína Bcr/Abl es una proteína-tirosina quinasa constitutivamente activa, que desencadena una leucemia mediante la activación de una serie de vías de señalización.

Puesto que la activación del oncogén *bcr/abl* es un evento tan reproducible en el desarrollo de la LMC, parecía ser un buen candidato contra el que desarrollar un inhibidor selectivo de tirosina-quinasas que podría se de utilidad clínica. Estos estudios dieron lugar al desarrollo del STI-571 o Gleevec como la primera droga terapéutica diseñada con éxito como inhibidor selectivo de una proteína oncogénica.

### Prevención y tratamiento

El desarrollo del STI-571 empezó con la identificación de la 2-fenilo-aminopirimidina como un inhibidor inespecífico de proteínas quinasas. A continuación, fueron sintetizados una serie de compuestos relacionados, y fueron optimizados en base a su actividad frente a distintas dianas, incluyendo la tirosina quinasa Abl. Entre muchos compuestos analizados en estas investigaciones, se encontró que el STI-571 era un inhibidor potente y específico de Abl, y de otras dos proteína-tirosina quinasas, el receptor del factor de crecimiento plaquetario y c-Kit. Estudios sucesivos, demostraron que el STI-571 inhibía específicamente la proliferación de células transformadas por oncogenes *bcr/abl*, incluyendo células de pacientes con LMC, en cultivo. Además, el STI-571 impedía la formación de tumores por parte de células transformadas con *bcr/abl* en ratones. Por el contrario, las células normales o células transformadas con otros oncogenes, no eran afectadas por el STI-571, demostrando su especificidad frente a la tirosina quinasa Bcr/Abl.

Basándose en estos resultados, se inició la fase I del ensayo clínico de STI-571 en Junio de 1998. Los resultados fueron sorprendentemente positivos. De los 54 pacientes en fase crónica tratados con STI-571, 53 respondieron a la droga. Es más, la respuesta al STI-571 se observó en más de la mitad de los pacientes en crisis blástica tratados. El éxito de estos estudios iniciales incitó una fase II expandida que incluía a más de 1.000 pacientes. Estos estudios confirmaron los resultados prometedores de la fase I, donde el 95% de los pacientes en fase crónica y aproximadamente el 50% de los pacientes en crisis blástica, respondieron al STI-571. Además, al contrario que las drogas quimioterapéuticas convencionales, el STI-571 poseía efectos secundarios mínimos. Estos estudios clínicos claramente demostraron que el STI-571 es una terapia altamente eficaz para la LMC, y dio lugar a una aprobación acelerada del STI-571 por parte de la FDA en Mayo del 2001—un hito en la traducción de la ciencia básica en práctica clínica.



Estructura cristalina del dominio paralítico de Abl formando un complejo con un derivado del STI-571. (De T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Millar, B. Clarkson y J. Kuriyan. 2000. *Science* 289: 1938.)

#### *Referencia*

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546.

que supera el efecto inhibidor de la proteína oncogénica PML/RARα. Este tratamiento con el ácido retinoico provoca la remisión de la leucemia en la mayoría de los pacientes, aunque esta respuesta favorable es temporal, y los pacientes vuelven a recaer. Sin embargo, el tratamiento combinado con ácido retinoico y con agentes quimioterapéuticos estándar reduce de manera significativa la incidencia de la recaída, por lo que la utilización del ácido retinoico resulta beneficiosa en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. La actividad terapéutica del ácido retinoico se detectó antes de que fuera identificado el oncogén *PML/RARα*, por lo que su efectividad contra las células leucémicas que expresan esta proteína oncogénica se descubrió por casualidad, en vez de mediante un diseño racional del medicamento. De todas maneras, la utilización del ácido retinoico en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda proporciona el primer ejemplo de un medicamento clínicamente útil dirigido contra una proteína oncogénica.

La herceptina, un anticuerpo monoclonal frente a la proteína oncogénica ErbB-2, fue la primera droga desarrollada frente a un oncogén específico que consiguió la aprobación de la FDA para su uso clínico en el tratamiento del cáncer. La proteína ErbB-2 se sobreexpresa en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama como resultado de la amplificación del gen *erb*B-2. En primer lugar se encontró que un anticuerpo frente al dominio extracelular de ErbB-2 (un receptor proteína-tirosina quinasa) inhibía la proliferación de células tumorales en las que se sobreexpresaba ErbB-2. Estos resultados llevaron al desarrollo y ensayo clínico de la Herceptina, que se encontró que reducía significativamente el crecimiento tumoral y prolongaba la supervivencia del paciente, en ensayos clínicos que incluían a más de 600 mujeres con cáncer de mama metastático en el que se sobreexpresaba la proteína ErbB-2. Basándose en estos resultados, la Herceptina fue aprobada por la FDA en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastático que expresase niveles elevados de ErbB-2.

Un área más ampliamente aplicable para el desarrollo de fármacos es la identificación de moléculas pequeñas inhibidoras de proteínas oncogénicas, incluyendo las proteínas quinasas que juegan papeles clave en la señalización de la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. Un avance reciente en este área ha sido el desarrollo de un inhibidor selectivo para la proteína-tirosina quinasa Bcr/Abl, que se genera por la translocación del cromosoma Filadelfia en la leucemia mieloide crónica (véase Fig. 15.25). Brian Druker y sus colaboradores, desarrollaron un inhibidor potente y específico de la proteína quinasa Bcr/Abl y demostraron que este compuesto (denominado STI-571 o Gleevec) bloquea eficazmente la proliferación de las células de leucemia mieloide crónica. Basándose en estos resultados, se inició un ensayo clínico del STI-571 en junio de 1998. Las respuestas a STI-571 fueron notables, y el compuesto poseía efectos secundarios mínimos. El notable éxito del STI-571 en estos ensayos clínicos sirvió como base para su rápida aprobación por la FDA en Mayo del 2001, para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. A pesar de que algunos pacientes desarrollan una resistencia frente a este fármaco, el STI-571 es indudablemente una terapia muy eficaz para esta leucemia. Como primer fármaco de diseño, desarrollado como un inhibidor específico de un oncogén, su descubrimiento es un hito en la aplicación de la investigación básica al tratamiento del cáncer.

El ejemplo del STI-571 claramente sugiere que la explotación continuada de los oncogenes y los genes supresores de tumores como dianas para el desarrollo de drogas, posee el potencial de conducir a una nueva generación de drogas que actúen selectivamente contra las células cancerosas. El desarrollo de fármacos dirigidos contra las proteínas Ras es un área de exploración activa, acorde con el predominio de los oncogenes *ras* en los tumores humanos. Las proteínas Ras están dirigidas a la membrana plasmática mediante la adición de un farnesil isoprenoide en su extremo carboxilo terminal (véase Fig. 7.32). Puesto que se trata de un tipo relativamente infrecuente de modificación proteica, se han investigado los inhibidores de la farnesilación como drogas terapéuticas, y se está evaluando su potencial utilidad clínica en el tratamiento del cáncer hu-

mano. Una amplia variedad de inhibidores de proteínas quinasas, incluyendo inhibidores del receptor de EGF, Raf, MEK y Akt, además de inhibidores de la PI3-quinasa, también se están desarrollando como potenciales fármacos anticancerosos. Además de los inhibidores de PI3-quinasa y Akt, se están estudiando otros fármacos que podrían incrementar la sensibilidad de las células cancerosas a la apoptosis, incluyendo los que se unen a p53 y pueden restaurar la actividad de proteínas de p53 mutadas. A pesar de que el impacto final de la biología molecular sobre el tratamiento del cáncer está aún por ver, está claro que el diseño racional de fármacos dirigidos frente a oncogenes específicos y proteínas supresoras de tumores desempeñará un papel importante.

## RESUMEN

### DESARROLLO Y CAUSAS DEL CÁNCER

***Tipos de cáncer:*** El cáncer se debe a la proliferación incontrolada de cualquier tipo de célula. La distinción más importante, para el paciente, es entre tumores benignos, que permanecen en el lugar de origen, y tumores malignos, que pueden invadir el tejido circundante sano y diseminarse por el organismo.

***Desarrollo del cáncer:*** Los tumores se desarrollan a partir de una única célula alterada que comienza a proliferar de manera anormal. Mutacionesadicionales darán lugar a la selección de aquellas células con una mayor capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis.

***Causas del cáncer:*** La radiación y muchos otros carcinógenos químicos actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Otros carcinógenos químicos contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular. Los virus también causan cáncer en humanos y en otras especies.

***Propiedades de las células cancerosas:*** La proliferación incontrolada de las células cancerosas se refleja en que tienen poca necesidad de factores de crecimiento extracelulares, y en la ausencia de la inhibición por contacto célula-célula. Muchas células cancerosas también se diferencian de manera defectuosa, lo que está de acuerdo con su proliferación continua *in vivo*. La incapacidad característica de las células cancerosas de sufrir apoptosis también contribuye de una manera importante al desarrollo del tumor.

***Transformación de las células en cultivo:*** El desarrollo de ensayos de transformación celular *in vitro*, ha permitido estudiar la conversión de células sanas en células tumorales, en cultivos celulares.

### VIRUS TUMORALES

***Virus de la hepatitis B y C:*** Los virus de la hepatitis B y C pueden causar cáncer hepático en humanos.

***SV40 y poliomavirus:*** Aunque ni el SV40 ni el poliomavirus causan cáncer en humanos, son modelos importantes para estudiar la biología molecular de la transformación celular. El antígeno T del SV40 induce la transformación mediante su interacción con las proteínas celulares supresoras de tumores Rb y p53.

***Papilomavirus:*** Los papilomavirus inducen tumores en diversos animales, incluyendo el carcinoma cervical en humanos. Al igual que el antígeno T de SV40, las proteínas transformantes de los papilomavirus interaccionan con Rb y p53.

***Adenovirus:*** Los adenovirus no causan cánceres de manera natural en el hombre ni en otras especies, pero son un modelo importante en la investigación del cáncer. Sus proteínas también interaccionan con Rb y p53.

***Herpesvirus:*** Los herpesvirus, que están entre los virus animales más complejos, provocan el cáncer en varias especies, incluido el hombre. La biología molecular de la transformación por estos virus aun no se comprende muy bien.

## PALABRAS CLAVE

**cáncer, tumor, tumor benigno, tumor maligno, metástasis, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma**

**iniciación del tumor, progresión del tumor, adenoma, pólipo**

**carcinógeno, promotor tumoral**

**inhibición dependiente de la densidad, estimulación autocrina del crecimiento, inhibición por contacto, angiogénesis, muerte celular programada, apoptosis**

**transformación celular**

**virus tumoral, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C**

**virus de simio 40 (SV40), poliomavirus**

**papilomavirus**

**adenovirus**

**herpesvirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, virus de Epstein-Barr**

**retrovirus, virus del sarcoma de Rous (RSV)**

***Retrovirus:*** Los retrovirus causan el cáncer en el hombre y en otros animales. Algunos retrovirus tienen genes específicos responsables de inducir la transformación celular, y a partir de estudios realizados con estos retrovirus altamente oncogénicos se han caracterizado oncogenes virales y celulares.

## ONCOGENES

**oncogén, *src*, *ras*, *raf***

***Oncogenes retrovíricos:*** El primer oncogén identificado fue el gen *src* del RSV. Estudios posteriores han identificado más de dos docenas de oncogenes distintos en diferentes retrovirus.

**proto-oncogén**

***Proto-oncogenes:*** Los oncogenes de los retrovirus se originaron a partir de genes similares de células sanas denominados proto-oncogenes. Los oncogenes son formas de sus correspondientes proto-oncogenes que están mutadas o que se expresan de manera anormal.

***ras*, c-*myc*, *abl*, N-*myc*, *erb*B-2**

***Oncogenes en el cáncer en el hombre:*** En el cáncer en el hombre, diversos oncogenes se activan a partir de mutaciones puntuales, reordenamientos del ADN, y amplificaciones. Algunos de estos oncogenes de tumores humanos, como los genes *ras*, son los homólogos celulares de aquellos oncogenes que se describieron por primera vez en los retrovirus.

**Fos, Jun, *D*1, ErbA, PML/RAR$\alpha$, PI 3-quinasa, Akt, Bcl-2**

***Funciones de los productos oncogénicos:*** La mayoría de las proteínas oncogénicas intervienen como componentes de las vías de señalización que estimulan la proliferación celular. El gen que codifica la ciclina D1 también es un oncogén potencial, que estimula la progresión del ciclo celular. Otras proteínas oncogénicas interfieren con la diferenciación celular, y los oncogenes que codifican la PI 3- quinasa, Akt y Bcl-2 inhiben la apoptosis.

## GENES SUPRESORES DE TUMORES

**gen supresor de tumores, *Rb*, *p53***

***Identificación de los genes supresores de tumores:*** A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores inhiben el desarrollo del tumor. El prototipo de un gen supresor de tumores, *Rb*, se identificó a partir de los estudios sobre la herencia del retinoblastoma. La pérdida o la inactivación por mutación de *Rb* y de otros genes supresores de tumores, como *p53*, contribuye a que se desarrollen diversos tipos de cáncer en el hombre.

**PTEN**

***Funciones de los productos de los genes supresores de tumores:*** Las proteínas codificadas por la mayoría de los genes supresores de tumores intervienen como inhibidores de la proliferación o de la supervivencia celular. Las proteínas Rb, INK4, y p53 son reguladores negativos de la progresión del ciclo celular. Además, p53 se requiere para la apoptosis inducida por lesión del ADN y por otros estímulos, por lo que su inactivación contribuye a estimular la supervivencia de la célula tumoral.

***Papel de los oncogenes y de los genes supresores de tumores en el desarrollo del tumor:*** Las mutaciones en los oncogenes y en los genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo progresivo de los cánceres en el hombre. Se considera que la acumulación de los daños en varios de estos genes origina la alteración de la proliferación, diferenciación y supervivencia que caracteriza a la célula cancerosa.

## APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA PREVENCIÓN Y AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

***Prevención y detección precoz:*** Muchos cánceres se pueden curar si se detectan en una etapa temprana del desarrollo del tumor. Las pruebas genéticas para identificar a aquellos individuos que tengan una tendencia hereditaria a desarrollar un cáncer, pueden permitir una detección precoz y un tratamiento más eficaz de los individuos de alto riesgo.

***Diagnóstico molecular:*** La detección de mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores puede ser útil en el diagnóstico y en el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

***Tratamiento:*** El desarrollo de drogas dirigidas contra oncogenes o contra genes supresores de tumores específicos, puede conducir a que se descubran nuevos agentes terapeúticos que actúen de manera selectiva contra las células cancerosas.

## Preguntas

**1.** ¿Qué es un cáncer y cómo difiere de un tumor benigno?

**2.** ¿Cuál es el papel de la selección clonal en el desarrollo del cáncer?

**3.** ¿Cómo aumentan los estrógenos el riesgo de padecer un cáncer?

**4.** ¿Por qué es peligrosa la estimulación autocrina del crecimiento?

**5.** Los adenovirus, papilomavirus y SV40 actúan todos sobre los mismos genes o productos génicos para inducir la transformación. ¿Qué son?

**6.** Has construido un antígeno T mutado del SV40 que no puede inducir la transformación celular, ya que no se une a Rb. Si este antígeno T mutado se introdujera en las células junto con un ADNc de papilomavirus que codificara para E7, ¿crees que causaría la transformación de estas células? ¿Y si el ADNc codificara para E6?

**7.** El AMPc suele inhibir la proliferación de los fibroblastos. ¿Crees que *gsp* actuaría como un oncogén en estas células?

**8.** ¿Cómo puede convertirse un protooncogén en un oncogén sin un cambio o una mutación de su secuencia codificante? Explica dos formas en las que podría ocurrir.

**9.** ¿Qué efecto podría esperarse de la sobreexpresión del producto del gen supresor de tumores *INK4* en células tumorales en las que se ha inactivado *Rb* mediante una mutación?

**10.** ¿Qué tumores consideras que serían más sensibles al tratamiento con radiación —los tumores con el gen *p53* salvaje *(wild-type)* o con el gen *p53* mutado?

**11.** Puesto que la susceptibilidad al retinoblastoma se hereda como un carácter dominante, ¿por qué no se desarrollan en tumores todas las células retinianas de niños con este carácter dominante?

**12.** ¿Cómo funciona el STI-571, el primer fármaco de diseño desarrollado como un inhibidor específico de un oncogén?

## Bibliografía


### *Referencias generales*

Cooper, G. M. 1992. *Elements of Human Cancer*. Boston: Jones and Bartlett.

Cooper, G. M. 1995. *Oncogenes*. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett.

Varmus, H. and R. A. Weinberg. 1993. *Genes and the Biology of Cancer*. New York: Scientific American Library.

### *Desarrollo y causas del cáncer*

Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer* 2: 563-572. [R]

Christofori, G. and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24: 73-76. [R]

Fialkow, P. J. 1979. Clonal origin of human tumors. *Ann. Rev. Med.* 30: 135-143. [R]

Hanahan, D. and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364. [R]

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70. [R]

Henderson, B. E., R. Ross and L. Bernstein. 1988. Estrogens as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 48: 246-253. [R]

Liotta, L. A. and E. C. Kohn. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379. [R]

Nowell, P. C. 1986. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46: 2203-2207. [R]

Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-395. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400. [R]

Sawyers, C. L., C. T. Denny and O. N. Witte. 1991. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 64: 337-350. [R]

Sporn, M. B. and A. B. Roberts. 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Science* 313: 745-747. [R]

Temin, H. M. and H. Rubin. 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in culture. *Virology* 6: 669-688. [P]

Tenen, D. G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Rev. Cancer* 3: 89-101. [R]

Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462. [R]

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *J. Amer. Med. Assoc.* 288: 321-333. [P]

### *Virus tumorales*

Bishop, G. A. and L. K. Busch. 2002. Molecular mechanisms of B-lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus. *Microbes and Infection* 4: 853-857. [R]

Blumberg, B. S. 1997. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7121-7125. [R]

Boshoff, C. and R. Weiss. 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373-382. [R]

Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Var-

mus, eds. 1997. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman and S. E. Straus, eds. 1996. *Fundamental Virology*. 3rd ed. New York: Lippincott-Raven.
Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 1999. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, DC: ASM Press.
Giannini, C. and C. Brechot. 2002. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Diff.* 10: S27-S38. [R]
Helt, A.-M. and D. A. Galloway. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24: 159-169. [R]
Jenner, R. G. and C. Boshoff. 2002. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 1-22. [R]
Lam, N. and B. Sugden. 2002. CD40 and its viral mimic, LMP1: Similar means to different ends. *Cell. Signalling* 15: 9-16. [R]
Mortreux, F., A.-S. Gabet and E. Wattel. 2003. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis *in vivo*. *Leukemia* 17: 26-38. [R]
Saenz-Robles, M. T., C. S. Sullivan and J. M. Pipas. 2001. Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20: 7899-7907. [R]
Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2: 342-350. [R]

### Oncogenes

Aaronson, S. A. 1991. Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1153. [R]
Adams, J. M. and S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26: 61-66. [R]
Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411: 355-365. [R]
Bos, J. L. 1989. *Ras* oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689. [R]
Datta, S. R., Brunet, A. and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three *Akts*. *Genes Devel.* 13: 2905-2927. [R]
Davies, H. and 51 others. 2002. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954 [P]
Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637-3640. [P]
Krontiris, T. G. and G. M. Cooper. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1181-1184. [P]
Leder, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub. 1983. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771. [R]
Legauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649. [R]
Look, A. T. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278: 1059-1064. [R]
Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227: 1021-1023. [P]
Melnick, A. and J. D. Licht. 1999. Deconstructing a disease: RARα, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215. [R]
Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velescu. 2002. *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934. [P]
Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677. [R]
Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 300: 539-542. [P]
Solomon, E., J. Borrow and A. D. Goddard. 1991. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254: 1153-1160. [R]
Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173. [P]
Sugden, B. 1993. How some retroviruses got their oncogenes. *Trends Biochem. Sci.* 18: 233-235. [R]
Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143-149. [P]
Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]
Testa, J. R. and A. Bellacosa. 2001. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10983-10985. [R]
Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462. [R]
Vivanco, I. and C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer* 2: 489-501. [R]
Vogt, P. K. 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 46: 939-946. [P]

### Genes supresores de tumores

Bienz, M. and H. Clevers. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320. [R]
Cantley, L. C. and B. G. Neel. 1999. New insights into tumor suppression: *PTEN* suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4240-4245. [R]
Classon, M. and E. Harlow. 2002. The retino blastoma tumour suppressor in develop ment and cancer. *Nature Rev. Cancer* 2: 910-917. [R]
Fearon, E. R. 1997. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278: 1043-1050. [R]
Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646. [P]
Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana. 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363-368. [P]
Kinzler, K. W. and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170. [R]
Knudson, A. G. 1976. Mutation and cancer: A statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820-823. [P]
Lee, W.-H., R. Bookstein, F. Hong, L.-J. Young, J.-Y. Shew and E. Y.-H. P. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: Clon ing, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399. [P]
Massague, J., S. W. Blain and R. S. Lo. 2000. TGFb signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309. [R]
Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677. [R]
Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]
Venkitaraman, A. R. 2002. Cancer suscepti bility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171-182. [R]
Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine. 2000. Surfing the *p53* network. *Nature* 408: 307-310. [R]
Yu, J., Z. Wang, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and L. Zhang. 2003. *PUMA* mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. [P]

### Aplicaciones de la biología molecular a la prevención y al tratamiento del cáncer

Alizadeh, A. A. and 31 others. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511. [P]
Balmain, A. 2002. Cancer as a complex genetic trait: Tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* 108: 145-152. [R]
Dancey, J. and E. A. Sausville. 2003. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature Rev. Drug Discovery* 2: 296-313. [R]
Degos, L., H. Dombret, C. Chomienne, M.-T. Daniel, J.-M. Miclea, C. Chastang, S. Castaigne and P. Fenaux. 1995. All-*trans*-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85: 2643-2653. [R]
Downward, J. 2002. Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 3: 11-22. [R]
Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546. [R]
Hampton, G. M. and H. F. Frierson, Jr. 2003. Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol. Med.* 9: 5-10. [R]

Harries, M. and I. Smith. 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-Related Cancer* 9: 75-85. [R]

Kerbel, R. and J. Folkman. 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Rev. Cancer* 2: 727-739. [R]

Oliff, A. 1999. Farnesyltransferase inhibitors: Targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1423: C19-C30. [R]

Perera, F. P. 1997. Environment and cancer: Who are susceptible? *Science* 278: 1068-1073. [R]

Ponder, B. 2001. Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341. [R]

Thun, M. J., S. J. Henley and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 252-266. [R]

# *Respuestas a las cuestiones*

## Capítulo 1

1. a) Usan ADN como su material genético.
   b) Están rodeados por una membrana plasmática.
   c) Emplean los mismos mecanismos básicos para la producción de energía.
   d) Todos utilizan ribosomas para sintetizar proteínas de forma similar.

3. Ácidos nucleicos

5. Porque creó una unidad autocontenida capaz de mantener a las macromoléculas como un paquete que entonces podía reproducirse y evolucionar como una unidad.

7. El índice de refracción del aire es 1,0; el índice de refracción del aceite es aproximadamente 1,4. Puesto que la resolución = $0{,}61\lambda/\eta$ sen $\alpha$ ($\eta$ es el índice de refracción), observar una muestra a través del aire en vez de a través del aceite supone que el límite de resolución varíe de 0,2 $\mu$m a 0,3 $\mu$m.

9. La centrifugación de velocidad separa a los orgánulos en base a su tamaño y forma, mientras que la centrifugación de equilibrio los separa en base a su densidad (independiente de forma y tamaño).

11. Estas células retienen su capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares del adulto, por lo que ofrecen el potencial de sustituir terapéuticamente a las células enfermas.

## Capítulo 2

1. El agua es una molécula polar cuyos hidrógenos y oxígeno pueden formar puentes de hidrógeno entre ellos (para hacer que el agua sea líquida a la mayoría de las temperaturas de la Tierra) y sirve como un buen disolvente para las moléculas orgánicas polares y para los iones inorgánicos. El agua también repele a las moléculas, o a sus partes apolares y las obliga a asociarse entre ellas para formar estructuras importantes como la membrana celular y de los orgánulos.

3. El glucógeno es un polímero de la glucosa conectado principalmente por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$glicosídicos, y posee ocasionalmente enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ que producen ramificaciones. La celulosa es un polímero rectilíneo, sin ramificaciones, de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ entre residuos de glucosa.

5. Las grasas se acumulan en gotas lipídicas en las células (especialmente adipocitos) y son una forma eficaz de almacenaje de energía. Los fosfolípidos funcionan como el principal componente de las membranas celulares.

7. La glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, cisteína, metionina, fenilalanina y el triptófano. Ya que tienden a ser repelidos por el agua, generalmente se localizan en el interior de una enzima soluble en agua.

9. Al sustituir los valores dados en la ecuación

$$\Delta G = \Delta G + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

   se obtiene el siguiente resultado: $\Delta G = -1{,}93$ kcal/mol. Por lo tanto, la reacción procederá de izquierda a derecha, lo que significa que, en la célula, A se convertirá en B más C.

11. Las proteínas transportadoras deben unir cada molécula de soluto transportado en un sitio específico, cambiar de conformación, liberarlo en el otro lado y volver a su configuración original; esto lleva más tiempo que pasar a través de un canal sin la unión y los cambios conformacionales.

## Capítulo 3

1. La traducción es la síntesis de proteínas a partir de un molde de ARN.

3. Se añadió poli-U en lugar de ARNm en un experimento de traducción *in vitro*, y se produjo poli-fenilalanina. Puesto que el único nucleótido presente era el uracilo y otras evidencias sugerían un código de tripletes, la primera correspondencia fue el codón UUU para la fenilalanina.

5. La adición o deleción de uno o dos nucleótidos alteraría el marco de lectura de los tripletes desde ese punto en adelante, dando lugar a una secuencia de aminoácidos completamente diferente, mientras que un cambio de tres nucleótidos añade o elimina a un solo

aminoácido. Con frecuencia esto da lugar a una proteína que funciona con normalidad.

7. Permite a la secuencia de ADN amplificarse en millones de copias, si existen secuencias cortas en los extremos de secuencia conocida.

9. UGC también codifica para la cisteína, por lo que esta mutación no tendrá ningún efecto sobre la función del enzima. Sin embargo, UGA es un codón de terminación, por lo que esta mutación impedirá la actividad enzimática.

11. El espermatozoide haploide contiene una única copia inicial de la secuencia de DNA. Cada ciclo de PCR amplifica por dos el material inicial, por lo que diez ciclos darían lugar a $2^{10}$, aproximadamente mil copias. Al amplificarlo por 30 ciclos se generarían $2^{30}$, o más de mil millones de copias.

13. Las mutaciones en los aminoácidos que nos interesen se podrán generar por mutagénesis *in vitro*. Entonces, los efectos de estas mutaciones en la actividad catalítica se determinarán a partir de la expresión de las proteínas mutadas en bacterias o en células eucariotas.

## Capítulo 4

1. Los organismos con genomas mayores que su complejidad parecerían necesitar mayores cantidades de ADN no codificante entre sus genes o entre los exones que codifican proteínas.

3. El *splicing* alternativo permite que un solo gen codifique distintas proteínas. Esto incrementa el número de proteínas distintas que un organismo puede producir sin aumentar el número de genes.

5. Un centrómero es una región del cromosoma eucariótico que sirve como un sitio de asociación entre cromátidas hermanas y los sitios de unión a las fibras del huso durante la mitosis.

   Un cinetócoro es una estructura que se forma en el centrómero durante la mitosis a la que se unen los microtúbulos del huso.

7. a) Para prevenir que los extremos de los cromosomas sean degradados o unidos entre sí.

   b) Para permitir la replicación completa de los extremos de los cromosomas.

9. Un marco de lectura abierto es una larga secuencia de nucleótidos que no codifica codones de terminación (UAA, UAG, UGA).

   Su importancia reside en que los marcos de lectura abiertos son generalmente genes funcionales.

11. La reasociación del DNA es una reacción bimolecular, por lo que la velocidad de la reacción es proporcional al cuadrado de la concentración del DNA. Por lo tanto, una secuencia que aparece repetida mil veces en el genoma se reasociará con una velocidad $10^6$ veces mayor que la que aparezca una sola vez.

## Capítulo 5

1. Las polimerasas I y II están implicadas en la reparación del ADN dañado. La polimerasa III es la principal enzima implicada en la replicación del ADN, aunque la polimerasa I retira los moldes de ARN y rellena los huecos entre fragmentos de Okazaki en la hebra tardía.

3. La topoisomerasa I corta una hebra del ADN en doble hélice y le permite girar en torno al otro enlace fosfodiéster para aliviar la tensión del giro. La topoisomerasa II corta a ambas hebras del ADN en doble hélice y puede pasar otra molécula de ADN a través del corte para separar las moléculas asociadas (p. ej., durante la mitosis).

5. El genoma de los mamíferos es mil veces mayor y se replica más despacio, de modo que necesita más orígenes de replicación para completarla en las pocas horas de una fase típica de síntesis de ADN.

7. La telomerasa es una transcriptasa inversa que usa su propia secuencia interna de ARN para añadir una secuencia corta complementaria de ADN en el extremo 3′ del ADN del telómero.

9. Las roturas de doble hebra pueden repararse mediante la reparación recombinatoria. La recombinación con un cromosoma homólogo, como una cromátida hermana, puede permitir que la porción que falta de un cromosoma se copie desde una hebra sencilla del cromosoma homólogo.

11. La elevada frecuencia del cáncer de piel se debe a las lesiones en el ADN causadas por la radiación solar UV, las cuales se pueden reparar por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos. El que otros cánceres no tengan esta incidencia tan elevada sugiere que este tipo de lesión no es frecuente en los órganos internos, y que la mayoría de los cánceres se deben a otros tipos de mutaciones (p. ej., la incorporación de bases desapareadas durante la replicación del ADN).

13. Las transcriptasas inversas que serán afectadas por estos medicamentos serán la telomerasa y la transcriptasa inversa codificada por las secuencias LINE. La inhibición de las transcriptasas inversas LINE no será tóxica para la célula, pero la inhibición de la telomerasa podría interferir con la replicación de los extremos de los cromosomas.

## Capítulo 6

1. La lactosa se une a una proteína represora producida por el gen *i* e impide que el represor se una a la región

operadora del operón *lac*. Esto permite a la ARN polimerasa moverse a través del operador y leer las regiones codificadoras de proteína como un solo mensaje policistrónico.

3. El gen salvaje («wild-type») se regulará de una manera normal, pero el gen sensible a la temperatura se expresará de manera constitutiva. Por lo tanto, la $\beta$-galactosidasa se producirá a la temperatura permisiva, pero no a la temperatura no permisiva.

5. Los factores sigma se unen a secuencias que se encuentran 35 y 10 pares de bases antes del sitio de comienzo en la región del promotor y dirigen a la ARN polimerasa para que se una al promotor e inicie la transcripción en el sitio de comienzo. Una vez que se añaden unos 10 nucleótidos, $\sigma$ es retirado.

7. La ARN polimerasa I sólo transcribe el pre-ARNr 45S.

9. Los *enhancers* pueden actuar lejos de la secuencia codificadora mientras que los promotores se encuentran cerca de la secuencia codificadora.

   La ARN polimerasa II transcribe todos los ARNm y algunos ARN nucleares pequeños.

   La ARN polimerasa III transcribe los ARNt, 5S ARNr y algunos ARN pequeños.

11. Dos dominios diferentes de unión al ADN se podrán unir al dominio de activación del factor mediante *splicing* alternativo específico de tejido.

13. Uno de los dos cromosomas X es inactivado tempranamente durante el desarrollo de las hembras (o en los varones XXY). Un ARN denominado *Xist* es producido por el gen *Xist* en uno de los dos cromosomas, y se une a la mayoría de los genes de ese cromosoma. El ARN *Xist* recluta proteínas que reprimen la cromatina X, probablemente metilando las histonas y desencadenando la formación de heterocromatina.

## Capítulo 7

1. Muchos ARNt son capaces de formar enlaces de hidrógeno con más de un codón porque la tercera base de su anticodón puede «temblar» o aparearse de formas no estándar con numerosos nucleótidos distintos de sus pares complementarios habituales.

3. Se necesita una secuencia Shine-Delgarno.

5. La poliadenilación es un mecanismo importante de regulación de la traducción en el desarrollo temprano. Su inhibición bloquearía la traducción de muchos ARNms de oocitos tras la fecundación.

7. Las temperaturas elevadas pueden desnaturalizar las proteínas. Las proteínas de choque térmico son chaperonas que facilitan el replegamiento de estas proteínas desnaturalizadas en su estado nativo, restaurando así la pérdida de función proteica.

9. El tratamiento con fosfolipasa liberaría de la superficie celular una proteína unida a GPI, pero no una proteína transmembrana.

## Capítulo 8

1. Los tránscritos eucarióticos son procesados por corte y empalme, y su salida del núcleo puede ser regulada. Además, el acceso de los factores de transcripción a los genes que regulan a menudo se regula alterando su capacidad de transporte a través de los poros nucleares.

3. Sí, la proteína de 15 kDa, aunque no la de 100 kDa, puede entrar. Las proteínas de 20 kDa y menos pueden pasar libremente al núcleo a través de canales acuosos abiertos.

5. Un ejemplo de esto es NF-$\kappa$B, un regulador del gen de la inmunoglobulina de la cadena $\kappa$ ligera en los linfocitos B. En las células no estimuladas, I$\kappa$B se une a NF-$\kappa$B, y el complejo no puede ser internalizado en el núcleo. Tras la estimulación, I$\kappa$B es fosforilado y degradado por proteólisis mediada por la ubiquitina. Esto expone una señal de localización nuclear en NF-$\kappa$B, permitiéndole entrar en el núcleo y activar la transcripción de genes diana.

7. La inactivación de la señal de exportación nuclear resultaría en la retención de la proteína en el núcleo.

9. Las señales de localización nuclear parecen quedarse en las proteínas nucleares para que puedan volver a internalizarse tras la reformación de la envuelta nuclear durante la telofase de la mitosis. Las proteínas nucleares que no forman parte del aparato mitótico se liberan a la mezcla de citoplasma y nucleoplasma que resulta de la degradación de la envuelta nuclear.

## Capítulo 9

1. Palade y sus colaboradores trataron a las células acinares pancreáticas con un pulso de aminoácidos radioactivos, que se incorporan en las proteínas. La autorradiografía mostró que las proteínas marcadas se detectaron en primer lugar en el RE rugoso. Tras una corta «persecución» de aminoácidos no radiactivos, las proteínas marcadas se movieron al aparato de Golgi, y tras períodos más largos, las proteínas marcadas se encontraron en las vesículas secretoras y después en el exterior de las células. Esto demostró que la vía secretora es del RE rugoso → aparato de Golgi → vesículas secretoras → proteína secretada.

3. La translocación cotraduccional implica la unión a la partícula de reconocimiento de la señal y la translocación a través del translocón dirigido por el proceso de síntesis en los ribosomas. La translocación postraduccional dirige a un polipéptido al RE tras la finalización de la síntesis y no requiere una SRP. Un comple-

jo Sec 62/63 reconoce a un polipéptido que debe ser incorporado, y lo inserta en un translocón. El polipéptido es arrastrado al lumen del RE por una chaperona denominada «BiP».

5. Los grupos hidrocarbonados se añaden en el lumen del ER y del aparato de Golgi, que son topológicamente equivalentes al exterior de la célula.

7. Inicialmente, una secuencia señal dirige al polipéptido lisosómico naciente o a la proteína prelisosómica al RER, entonces se le añade un oligosacárido mediante un enlace N. Después de trasladarse al Golgi, se mantienen tres residuos de manosa que normalmente se eliminan, y se convierten en manosa-6-fosfato en un proceso en dos pasos (que tiene lugar en el *cis* Golgi). Estos residuos de manosa-6-fosfato son reconocidos y unidos por un receptor en la red del *trans* Golgi, que dirige su transporte a los lisosomas.

9. En ausencia de la síntesis de manosa-6-fosfato en el aparato de Golgi, las proteínas lisosomales normales serían secretadas.

11. Un sistema de transporte acelular fue utilizado por Rothman y sus colaboradores para demostrar el transporte vesicular de proteínas entre las cisternas del aparato de Golgi. Aislaron aparatos de Golgi de una línea celular mutante infectada con un virus, que carecía de la enzima que transfería N-acetilglucosamina a glicoproteínas, y los mezclaron con vesículas del Golgi de células normales, no infectadas.

    Las glicoproteínas víricas se modificaban con N-acetilglucosamina en el sistema Golgi mixto, que proporcionó la evidencia de que las proteínas habían pasado de una vesícula Golgi a otra por transporte vesicular.

## Capítulo 10

1. El área de superficie de la membrana mitocondrial interna es elevado debido a la formación de crestas. Además, el contenido proteico de la membrana es especialmente elevado (>70%), e incluye numerosa enzimas y transportadores de electrones.

3. Bajo estas condiciones $\Delta G$ es aproximadamente −1,4 kcal/mol.

5. La primera señal de internalización cargada positivamente desencadena la internalización en la matriz mitocondrial, donde esta presecuencia es retirada, y la segunda secuencia hidrofóbica dirige al polipéptido a Oxa1, una translocasa de la membrana mitocondrial interna que introduce el citocromo $b_2$ en el espacio intermembrana.

7. $F_0$ se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. $F_1$ es el tallo y el engrosamiento que se extiende desde $F_0$ hacia la matriz mitocondrial y hacia el estroma de los cloroplastos. El complejo $F_0$ proporciona un canal a través del cual los protones pueden volver a la matriz o al estroma. El acoplamiento mecánico del tallo dirige la rotación en el interior del complejo $F_1$ que causa la síntesis de ATP.

9. Se requieren dos electrones activados para romper cada molécula de agua, por lo que son necesarios 24 electrones activados para la síntesis de cada molécula de glucosa. El paso de estos electrones a través de los dos fotosistemas genera 12 moléculas de NADPH y entre 12 y 18 moléculas de ATP, dependiendo de la estequiometría del bombeado de protones en el complejo citocromo *bf*. Puesto que se requieren 18 moléculas de ATP para el ciclo de Calvin, la síntesis de glucosa puede necesitar ATPs adicionales producidos por el flujo cíclico de electrones.

11. Las proteínas peroxisómicas se sintetizan sobre ribosomas libres en el citosol y se dirigen a los peroxisomas mediante una secuencia de señal Ser-Lys-Leu en su extremo carboxilo terminal, o una secuencia de nueve aminoácidos en el extremo amino terminal. Estas secuencias son reconocidas por receptores e internalizadas a través de transportadores en la membrana sencilla del peroxisoma.

## Capítulo 11

1. A medida que se forma el filamento de actina, todas las subunidades asimétricas de actina G se añaden con la misma orientación, y así, los dos extremos del filamento son diferentes.

3. Las citocalasinas se unen a los extremos positivos de los filamentos de actina y bloquean su elongación. Así, el intercambio rotatorio de los microfilamentos despolimerizará. La faloidina se une a los filamentos de actina e inhibe su degradación. Los filamentos detendrán el intercambio rotatorio pero seguirán presentes y pueden hacerse más largos.

5. El diagnóstico más probable es la distrofia muscular de Duchenne. La causa de esta enfermedad es una mutación en el gen que codifica la distrofina, una proteína que une los filamentos de actina a la glicoproteína de la membrana plasmática celular, la cual une a las células musculares a la matriz extracelular.

7. La polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina. Si los filamentos de actina no fueran polares no se podría producir el movimiento unidireccional de la miosina que resulta en el deslizamiento de los filamentos de actina y miosina.

9. No. Las queratinas sólo se expresan en las células epiteliales.

11. Mediante la unión de los dobletes de microtúbulos de los cilios, la nexina convierte el deslizamiento de los

microtúbulos individuales en un movimiento de flexión que conduce al bateado de los cilios. Si fuera eliminada, los microtúbulos simplemente se deslizarían unos respecto a otros.

## Capítulo 12

1. A temperaturas elevadas, la estructura anular del colesterol inhibe el movimiento de los fosfolípidos en la bicapa, reduciendo así la fluidez de la membrana y aumentando la estabilidad. A bajas temperaturas, la estructura del colesterol interfiere con las interacciones de la cadena de los ácidos grasos y mantiene la fluidez de la membrana.

3. La presencia de porinas en la membrana plasmática permitirá la libre difusión de los iones y de las moléculas pequeñas entre el citosol y el fluido extracelular —un desastre para la célula.

5. En primer lugar, el glicocálix protege la superficie celular (p. ej., de proteasas en el tracto intestinal). En segundo lugar, el glicocálix está implicado en las interacciones célula-célula (p. ej., a través de la unión a selectinas).

7. La pared celular vegetal impide la ruptura celular y permite que se genere una presión de turgencia.

9. Las bacterias gram-positivas sólo poseen una membrana sencilla, la membrana plasmática, rodeada por una gruesa pared celular de peptidoglicano. Las bacterias gram-negativas poseen una membrana plasmática, una membrana externa y una fina pared celular de peptidoglicano entre ambas membranas.

11. La correcta localización de los transportadores responsables del transporte activo y de la difusión facilitada es necesaria para la transferencia de la glucosa desde la luz intestinal al torrente sanguíneo; dicha función polarizada la realizan las células epiteliales. Las uniones estrechas impiden la difusión de estos transportadores entre las distintas zonas de la membrana plasmática, y sellan los espacios entre las células del epitelio.

## Capítulo 13

1. La señalización paracrina es cuando moléculas liberadas por una célula o unas pocas células afectan sólo a las células cercanas, mientras que la señalización endocrina es la liberación de hormonas por las glándulas endocrinas. Estas hormonas son transportadas a lo largo del cuerpo y actúan sobre cualquier célula diana que posee un receptor para dicha hormona.

3. Las moléculas señal hidrofóbicas pueden difundir a través de la membrana plasmática y unirse a los receptores citosólicos o nucleares. Las moléculas señal hidrofílicas, al igual que las hormonas proteicas, no pueden difundir a través de la membrana plasmática, de modo que se unen a receptores de la superficie celular.

5. La inhibición de la AMPc fosfodiesterasa dará lugar a un nivel elevado de AMPc, que estimulará la proliferación celular.

7. Los monómeros de PDGF no inducirán la dimerización del receptor. Puesto que esto es el primer paso en la señalización de las proteína-tirosina quinasas receptoras, los monómeros no serán capaces de activar el receptor de PDGF.

9. El AMPc se une a las subunidades reguladoras de la proteína quinasa A, liberando dos subunidades catalíticas menores de la proteína quinasa A, que son capaces de penetrar en el núcleo a través de los poros nucleares. En el núcleo, PKA fosforila a CREB, que se une a los CREs y activa a los genes inducibles por AMPc.

11. Cuando las células mueren como resultado de una lesión aguda o necrosis, se lisan y liberan su contenido al espacio extracelular, lo que causa inflamación (y puede inducir respuestas autoinmunes). Cuando mueren por apoptosis, sufren una serie programada de cambios que degradan las proteínas celulares y el ADN. Finalmente, la célula se degrada en una serie de pequeños trozos envueltos en membrana que pueden ser fagocitados eficazmente por los macrófagos y otras células fagocíticas.

## Capítulo 14

1. Las células en $G_0$ y $G_1$ poseen la misma cantidad de ADN (p. ej., diploide en la mayoría de las células humanas) y ambas son metabólicamente activas. Las células en $G_0$ difieren de las células en $G_1$ en que no proliferan a no ser que sean estimuladas para retomar el ciclo celular (p. ej., por niveles elevados de un factor de crecimiento específico).

3. La inhibición de los puntos de control en $G_1$ y S reduce la posibilidad de que el ADN dañado se replique antes de su reparación, lo que podría propagar el error. La inhibición del punto de control de $G_2$ permitirá tiempo para que cortes del ADN u otros daños sean reparados antes de que se produzca la mitosis, impidiendo que el ADN dañado pase a las células hijas.

5. La anafase se iniciará con normalidad. Sin embargo, MPF permanecerá activo, por lo que no se producirá la reconstitución de los núcleos, la descondensación de los cromosomas, ni la citocinesis.

7. El MPF fosforila a varias proteínas estructurales para alterar directamente sus propiedades e iniciar la mitosis. Entre ellas se encuentran las condensinas (responsables de la condensación cromosómica), la his-

tona H1, las láminas nucleares, la proteína GMI30 de la matriz del Golgi, y proteínas asociadas a los microtúbulos. EL MPF también inicia una cascada de proteína quinasas que desencadena la progresión a través de M.

**9.** Los oocitos de estos ratones no se detendrán en la metafase II.

**11.** Una célula madre es una célula que se divide para producir células hija que pueden diferenciarse o permanecer como células madre.

## Capítulo 15

**1.** Un cáncer es un tumor maligno. Los tumores malignos crecen y se dividen de forma incontrolada y pueden metastatizar o propagarse a otras partes del cuerpo. Los tumores benignos muestran un crecimiento anómalo pero permanecen confinados a su localización original.

**3.** Los estrógenos actúan como promotores de tumores aumentando la proliferación de células que responden a estrógenos como las células mamarias y endometriales.

**5.** Estos tres virus transforman células inactivando las proteínas supresoras de tumores, Rb y p53.

**7.** El gen *gsp* codifica la subunidad $\alpha$ de $G_s$, que activa la adenilato ciclasa. Por lo tanto, no actuará como un oncogén en aquellas células cuya proliferación se inhiba por AMPc.

**9.** *INC4* codifica el inhibidor p16 de Cdk, que inhibe los complejos Cdk4/ciclina D. Dado que la fosforilación de Rb es la principal diana de Cdk4/ciclina D, la sobreexpresión de p16 no tendrá ningún efecto en aquellas células en las que Rb haya sido inactivada.

**11.** A pesar de que la susceptibilidad es dominante, los heterocigotos poseen un gen Rb normal que produce suficiente proteína Rb para suprimir el crecimiento tumoral. Sólo cuando se muta ese gen Rb normal (un suceso probable dado el elevado número de células retinianas producidas durante el desarrollo), se desarrollará un tumor.

# Glosario

**α-actinina** Proteína de unión a la actina que entrelaza los filamentos de actina para formar haces contráctiles.

**α hélice** Estructura secundaria enrollada de una cadena polipeptídica formada por uniones de hidrógeno entre aminoácidos separados por cuatro residuos.

***abl*** Protooncogén que codifica una proteína-tirosina quinasa y que es activado por la translocación cromosómica en la leucemia mieloide crónica.

**acetilación de histonas** Modificación de histonas por la adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina.

**ácido abscísico** Hormona vegetal.

**ácido desoxirribonucleico (ADN)** Material genético de la célula.

**ácido retinoico** Molécula señalizadora sintetizada a partir de la vitamina A.

**ácido ribonucleico (ARN)** Polímero de ribonucleótidos.

**ácidos grasos** Cadenas largas hidrocarbonadas generalmente unidas a un grupo carboxílico ($COO^-$).

**ácidos nucleicos antisentido** Ácidos nucleicos (ARN o ADN) que son complementarios a un ARNm de interés y que se emplean para bloquear la expresión génica.

**acoplamiento quimiosmótico** Generación de ATP a partir de la energía almacenada en un gradiente protónico a través de una membrana.

**actina** Proteína abundante de 43-kd que polimeriza para formar filamentos del citoesqueleto.

**actina [F] filamentosa** Monómeros de actina polimerizados en filamentos.

**actina [G] globular** Monómeros de actina que no han sido ensamblados en filamentos.

**activadores transcripcionales** Factores de transcripción que estimulan a la misma.

**adaptina** Proteína de unión a receptores de membrana que media en la formación de vesículas revestidas por clatrina.

**adenina** Purina que se empareja tanto con timina como con uracilo.

**adenilato ciclasa** Enzima que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP.

**adenoma** Tumor benigno que aparece en el epitelio glandular.

**ADF/cofilina** Familia de proteínas de unión a la actina que desensamblan los filamentos de actina.

**adhesión focal** Sitio de unión de las células a la matriz extracelular en el que las integrinas se unen a haces de filamentos de actina.

**ADN complementario (ADNc)** Molécula de ADN que es complementaria a una molécula de ARNm, sintetizada *in vitro* por la transcriptasa inversa.

**ADN glicosilasa** Enzima de reparación del ADN que corta la unión de una purina o pirimidina a la desoxirribosa del esqueleto de una molécula de ADN.

**ADN ligasa** Enzima que sella roturas en las hebras de ADN.

**ADN polimerasa** Enzima que cataliza la síntesis de ADN.

**ADN satélite** ADN de secuencia sencilla repetitiva con una gran densidad que difiere de la mayoría del ADN genómico.

**Akt** Proteína-serina/treonina quinasa que se activa por $PIP_3$ y que desempeña un papel clave en la señalización de la supervivencia celular.

**alelo** Copia de un gen.

**almidón** Polímero de restos de glucosa que es la principal reserva de carbohidratos en las plantas.

**amiloplasto** Plástido que almacena almidón.

**aminoácido** Bloques de construcción monoméricos de las proteínas que constan de un átomo de carbono unido a un grupo carboxílico, a un grupo amino, a un átomo de hidrógeno, y a una cadena lateral específica.

**aminoacil ARNt sintetasa** Enzima que une un aminoácido específico a una molécula de ARNt que porta la secuencia correcta anticodón.

**AMPc fosfodiesterasa** Enzima que degrada el AMP cíclico.

**AMP cíclico (AMPc)** Adenosina monofosfato en la que el grupo fosfato está unido con enlace covalente a los átomos de carbono 3' y 5', formando una estructura cíclica; importante segundo mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas.

**amplificación génica** Aumento en el número de copias de un gen como resultado de una replicación repetida de una región de ADN.

**anafase** Fase de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso.

**anafase A** Movimiento de los cromosomas hijos hacia los polos del huso durante la mitosis.

**anafase B** Separación de los polos del huso durante la mitosis.

**anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)** Glicolípidos que contienen fosfatidilinositol y que anclan proteínas a la cara externa de la membrana plasmática.

**anfipática** Molécula que posee tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas.

**angiogénesis** Formación de nuevos vasos sanguíneos.

**anillo contráctil** Estructura de actina y miosina II que se forma por debajo de la membrana plasmática durante la mitosis y media la citocinesis.

**anquirina** Proteína que une espectrina y conecta el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática.

**anticodón** Secuencia nucleotídica del ARN de transferencia que forma pares de bases complementarios con una secuencia codón del ARN mensajero.

**anticuerpo** Proteína producida por los linfocitos B que se une a una molécula no propia.

**anticuerpo monoclonal** Anticuerpo producido por una línea clonal de linfocitos B.

**antígeno** Molécula contra la que se dirige el anticuerpo.

**antiporte** Transporte de dos moléculas en direcciones opuestas a través de la membrana.

**aparato de Golgi** Orgánulo citoplasmático implicado en el procesamiento y clasificación de proteínas y lípidos. En células vegetales, es también el lugar de síntesis de los polisacáridos de la pared celular.

**apoptosis** Proceso activo de muerte celular programada, caracterizado por la rotura del ADN cromosómico, la condensación de la cromatina, y la fragmentación tanto del núcleo como de la célula.

**apoptosoma** Complejo proteico en el que se activa la caspasa-9 para iniciar la apoptosis tras la liberación del citocromo c de las mitocondrias.

***Arabidopsis thaliana*** Planta pequeña, con floración, empleada como modelo en biología molecular vegetal y en biología del desarrollo vegetal.

**ARN pequeños nucleares (ARNsn)** ARN nucleares que varían en tamaño desde las 50 a las 200 bases.

**ARN pequeños nucleolares (ARNsno)** ARN pequeños presentes en el nucléolo que funcionan en el procesamiento de pre-ARNr.

**ARNsrp** Componente citoplásmico pequeño de ARN de la SRP.

**arqueobacteria** Uno de los dos grupos principales de procariotas; muchas especies de arqueobacterias viven en condiciones extremas similares a aquellas que existían en los orígenes de la tierra.

**ARF** Proteína de fijación del GTP necesaria para la gemación de vesículas desde la red del *trans*-Golgi.

**ARN de transferencia (ARNt)** Moléculas de ARN que actúan como adaptadores entre los aminoácidos y el ARNm durante la síntesis proteica.

**ARN mensajero (ARNm)** Molécula de ARN que sirve como molde para la síntesis proteica.

**ARN polimerasa** Enzima que cataliza la síntesis del ARN.

**ARN ribosomal (ARNr)** ARN componente de los ribosomas.

**ATP (adenosina 5'-trifosfato)** Nucleósido trifosfato compuesto por adenina que sirve de almacén de energía libre en la célula.

**ATP sintetasa** Complejo proteico asociado a la membrana que acopla el transporte de protones, energéticamente favorable, a través de una membrana, a la síntesis de ATP.

**ATPasa $Na^+$-$K^+$** Véase bomba $Na^+$-$K^+$.

**autofagosoma** Vesícula que contiene orgánulos internos encerrados por fragmentos de la membrana del retículo endoplásmico que se fusiona con los lisosomas.

**autofosforilación** Una reacción en la que una proteína quinasa cataliza su propia fosforilación.

**autofagia** Degradación de proteínas citoplasmáticas y orgánulos al ser englobadas en vesículas del retículo endoplasmático que se fusionan con lisosomas.

**autorradiografía** Detección de moléculas marcadas radioisotópicamente por exposición a una película de rayos X.

**auxina** Hormona vegetal que controla muchos aspectos del desarrollo de la planta.

**axonema** Estructura fundamental de cilios y flagelos compuesta por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes de microtúbulos.

**bacteriófago** Virus bacteriano.

**baculovirus** Virus empleado frecuentemente como vector de expresión para la producción de proteínas eucarióticas en células de insecto.

**barril-$\beta$** Dominio transmembrana formado por el plegamiento de láminas en una estructura con forma de barril.

**Bcl-2** Miembro de la familia de proteínas que regulan la muerte celular programada.

**biblioteca de ADNc** Colección de clones recombinantes de ADNc.

**biblioteca de ADN recombinante** Colección de clones de ADNc o genómico.

**biblioteca genómica** Colección de clones de ADN recombinante que, de forma colectiva, contienen el genoma de un organismo.

**bicapa fosfolipídica** Estructura básica de las membranas biológicas, donde las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos están inmersas en el interior de la membrana, y sus grupos polares se exponen a la solución acuosa a ambos lados de dicha membrana.

**bioinformática** Uso de métodos computacionales para analizar grandes cantidades de datos biológicos, como las secuencias genómicas.

**bomba de $Na^+$-$K^+$** Bomba iónica que transporta $Na^+$ fuera de la célula y $K^+$ dentro de la célula.

**bomba iónica** Proteína que acopla la hidrólisis de ATP al transporte de iones a través de una membrana.

**borde en cepillo** Superficie de una célula (p. ej., una célula epitelial del intestino) que contiene una capa de microvellosidades.

**brasinosteroide** Hormona esteroídica de plantas.

**cadena de transporte electrónico** Serie de transportadores mediante los cuales los electrones se transportan desde un estado de energía superior a uno inferior.

**cadherinas** Grupo de moléculas de adhesión celular que forman uniones estables célula-célula en las uniones adherentes y en los desmosomas.

***Caenorhabditis elegans*** Nemátodo empleado como modelo pluricelular sencillo en biología del desarrollo.

**caja TATA** Secuencia reguladora de ADN encontrada en los promotores de muchos genes eucarióticos transcritos por la ARN polimerasa II.

**callo** Masa indiferenciada de células vegetales en cultivo.

**CaM quinasa** Miembro de una familia de proteína quinasas que se activan por la unión de $Ca^{2+}$/calmodulina.

**canal iónico** Proteína que interviene en el tránsito rápido de iones a través de una membrana, mediante la formación de poros abiertos a través de la bicapa fosfolipídica.

**canales activados por ligando** Canales iónicos que se abren en respuesta a la unión de moléculas señalizadoras.

**canales activados por voltaje** Canales iónicos que se abren en respuesta a variaciones en el potencial eléctrico.

**calmodulina** Proteína de fijación del calcio.

**cáncer** Tumor maligno.

**caperuza de 5' metilguanosina** Estructura constituida por GTP y azúcares metilados que se añade al extremos 5' de los ARNm de los eucariotas.

**carbohidrato** Molécula de fórmula $(CH_2O)_n$. Los carbohidrtos incluyen, tanto azúcares simples, como polisacáridos.

**carcinógeno** Agente inductor de cáncer.

**carcinoma** Cáncer de células epiteliales.

**cardiolipina** Fosfolípido que contiene cuatro cadenas hidrocarbonadas.

**carioferina** Receptor de transporte nuclear.

**caspasas** Familia de proteasas que ocasionan la muerte celular programada.

**catalasa** Enzima que descompone peróxido de hidrógeno.

**caveolas** Pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que pueden estar implicadas en la endocitosis.

**Cdc2** Proteína-serina/treonina quinasa, que es un regulador clave de la mitosis en las células eucariotas.

**Cdc42** Miembro de la subfamilia Rho de proteínas de unión al GTP de bajo peso molecular.

**Cdks** Proteína quinasas ciclina dependientes que controlan el ciclo celular de las eucariotas. Véase también Cdc2.

**célula madre** Célula que se divide para dar lugar a células hijas que pueden diferenciarse o permanecer como células madre.

**célula parenquimática** Clase de célula vegetal responsable de la mayoría de las actividades metabólicas.

**células de esclerénquima** Células vegetales caracterizadas por gruesas paredes celulares que proporcionan apoyo estructural a la planta.

**células madre embrionarias (ES)** Células cultivadas a partir de embriones tempranos.

**células epidérmicas** Células que forman una capa protectora en las superficies de plantas y animales.

**células epiteliales** Células formadoras de láminas (tejido epitelial) que recubren la superficie del cuerpo y delimitan los órganos internos.

**células eucariotas** Células que presentan una envoltura nuclear, orgánulos citoplasmáticos y un citoesqueleto.

**células procariotas** Células que carecen de envuelta nuclear, de orgánulos citoplasmáticos y de citoesqueleto (fundamentalmente bacterias).

**celulosa** Principal componente estructural de la pared celular vegetal, polímero lineal de restos de glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta(1 \rightarrow 4)$.

**celulosa sintasa** Enzima que cataliza la síntesis de celulosa.

**centrifugación de velocidad** Separación de partículas basadas en sus tasas de sedimentación.

**centrifugación diferencial** Método empleado para separar los componentes de las células en base a su tamaño y densidad.

**centrifugación por equilibrio** Separación de partículas en función de la densidad, mediante centrifugación, hasta el equilibrio en un gradiente de una sustancia densa.

**centrifugación por gradiente de densidad** Método de separación de partículas por centrifugación a través de gradiente de una sustancia densa, como sacarosa o cloruro de cesio.

**centriolo** Estructura cilíndrica consistente en nueve tripletes de microtúbulos en los centrosomas de la mayoría de las células animales.

**centro activo** Región de una enzima que une sustratos y cataliza una reacción enzimática.

**centro de organización de microtúbulos** Punto de anclaje cerca del centro de la célula desde donde la mayoría de los microtúbulos se extienden hacia fuera.

**centrómero** Región del cromosoma especializada que conecta las cromátidas hermanas y las fija al huso mitótico.

**centrosoma** Centro de organización microtubular en células animales.

**chaperona** Proteína que facilita el correcto pliegue o ensamblaje de otras proteínas.

**chaperonina** Familia de proteínas de choque térmico dentro de las cuales se produce el pliegue proteico.

**cianobacteria** Procariotas mayores y más complejos en los cuales se cree que evolucionó la fotosíntesis.

**ciclinas** Familia de proteínas que regulan la actividad de Cdks y controlan la progresión a través del ciclo celular.

**ciclinas $G_1$ (Clns)** Ciclinas de levaduras que controlan el paso a través de START.

**ciclo de Calvin** Serie de reacciones mediante las cuales seis moléculas de $CO_2$ se transforman en glucosa.

**ciclo del glioxilato** Conversión de ácidos grasos a carbohidratos en vegetales.

**ciclo de Krebs** Ver ciclo de ácido cítrico.

**ciclo del ácido cítrico** Serie de reacciones en las cuales el acetil CoA se oxida a $CO_2$. Ruta central del metabolismo oxidativo.

**cilio** Proyección de la membrana plasmática, constituida por microtúbulos, que mueve a la célula a través de fluidos o al fluido sobre la célula.

**cinetocoro** Estructura especializada constituida por proteínas sujetas a un centrómero y que interviene en la fijación y movimiento de los cromosomas a lo largo del huso mitótico.

**cinturón de adhesión** Estructura con forma de cinturón en torno a las células epiteliales, en las que un haz contráctil de filamentos de actina está asociado a la membrana plasmática.

**citocalasina** Fármaco que bloquea la elongación de los filamentos de actina.

**citocromo *c*** Una proteína periférica de la membrana mitocondrial que transporta electrones durante la fosforilación oxidativa.

**citocromo oxidasa** Complejo proteico de la cadena de transporte electrónico que acepta electrones desde el citocromo *c* y los transfiere al $O_2$.

**citómetro de flujo** Instrumento que mide la intensidad de la fluorescencia de células individuales.

**citoquinas** Factores de crecimiento que regulan a las células sanguíneas y linfocitos.

**citoquinina** Hormona vegetal que regula la división celular.

**citocinesis** División de una célula tras la mitosis o meiosis.

**citosina** Pirimidina que se empareja con guanina.

**citoesqueleto** Red de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma de las células eucariotas. Proporciona el armazón estructural de la célula y es responsable de los movimientos celulares.

**clatrina** Proteína que reviste la superficie citoplasmática de las membranas celulares, se ensambla en celosías en forma de cesta y dirige la formación de vesículas.

**clon molecular** Véase molécula recombinante.

**clonación molecular** Inserción de un fragmento de ADN de interés en una molécula de ADN (vector) que es capaz de replicación independiente en una célula huésped.

**clonación reproductiva** Empleo de la transferencia nuclear para crear un organismo clonado.

**clonación terapéutica** Procedimiento en el que la transferencia nuclear en oocitos podría utilizarse para producir células madre embrionarias para su uso en la terapia de trasplante.

**clorofila** Pigmento fotosintético principal de células vegetales.

**cloroplasto** Orgánulo responsable de la fotosíntesis en las células de plantas y algas verdes.

***c*-myc** Protooncogén que codifica un factor de transcripción y frecuentemente es activado por la translocación cromosómica o la amplificación génica en tumores humanos.

**código de histonas** Combinaciones de modificaciones específicas de las histonas que se cree que regulan la actividad transcripcional de la cromatina.

**código genético** Correspondencia entre tripletes de nucleótidos y aminoácidos en las proteínas.

**codón** Unidad básica del código genético; uno de los 64 tripletes de nucleótidos que codifican un aminoácido o una secuencia de terminación.

**coenzima A (CoA)** Coenzima que actúa como transportador de grupos acetilo en reacciones metabólicas.

**coenzima Q** Pequeña molécula liposoluble que transporta electrones entre complejos proteicos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

**coenzimas** Moléculas orgánicas de bajo peso molecular que trabajan junto con las enzimas para catalizar reacciones biológicas.

**cohesinas** Complejo de proteínas que mantienen la conexión entre cromátidas hermanas.

**cola de poli-A** Extensión de aproximadamente 200 nucleótidos de adenina que se añade a los extremos 3' de los ARNms eucariotas.

**colágeno** Principal proteína estructural de la matriz extracelular.

**colcemida** Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.

**colchicina** Fármaco que inhibe la polimerización de microtúbulos.

**colénquima** Células vegetales caracterizadas por gruesas paredes celulares; proporcionan apoyo estructural a la planta.

**colesterol** Lípido constituido por cuatro anillos hidrocarbonados. El colesterol es el principal constituyente de las membranas plasmáticas de células animales y es el precursor de hormonas esteroideas.

**complejo ARP 2/3** Complejo proteico que se une a los filamentos de actina e inicia la formación de ramificaciones.

**complejo de unión** Región de contacto célula-célula que contiene una unión estrecha, una unión adherente y un desmosoma.

**complejo del citocromo *bf*** Complejo proteico de la membrana del tilacoide que transporta electrones durante la fotosíntesis.

**complejo del origen de replicación (ORC)** Complejo proteico que inicia la replicación del ADN en los puntos de origen en levaduras.

**complejo del poro nuclear** Gran estructura que forma un canal de transporte a través de la envuelta nuclear.

**complejo promotor de la anafase** Ubiquitina ligasa que desencadena la progresión de la metafase a la anafase mediante la señalización de la degradación de ciclina B y cohesinas.

**complejo sinaptonémico** Estructura proteica en forma de cremallera que se forma a lo largo de los cromosomas homólogos emparejados durante la meiosis.

**complejo Tic** Complejo de translocación proteica de la membrana interna del cloroplasto.

**complejo Tim** Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial interna.

**complejo Toc** Complejo de translocación proteica de la membrana externa del cloroplasto.

**complejo Tom** Complejo de translocación proteica de la membrana mitocondrial externa.

**conexina** Miembro de la familia de proteínas transmembrana que forma las uniones de tipo *gap*.

**corrección de pruebas** Retirada selectiva de bases mal apareadas por parte de la ADN polimerasa.

**correpresor** Proteína que se asocia con represores para inhibir la expresión génica, a menudo modificando la estructura de la cromatina.

**córtex celular** Red de actina subyacente a la membrana plasmática.

**corticoesteroides** Hormonas esteroideas producidas por la glándula adrenal.

**cósmido** Vector que contiene secuencias del bacteriófago $\lambda$, secuencias de resistencia a antibióticos, y un origen de replicación. Puede acomodar grandes insertos de ADN de incluso 45 kb.

**CREB** Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico. Un factor de transcripción que se activa por acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc.

**cremallera de leucina** Dominio de dimerización proteico que contiene restos repetidos de leucina; se encuentra en muchos factores de transcripción.

**cresta** Pliegue en la membrana mitocondrial interna que se extiende dentro de la matriz.

**criofractura** Método de microscopía electrónica que consiste en que las muestras se congelan en nitrógeno líquido y después se fracturan para escindir la bicapa lipídica, mostrando así las caras internas de las membranas celulares.

**cristalografía de rayos X** Método en el que el patrón de difracción de rayos X es utilizado para determinar la organización de los átomos individuales dentro de una molécula.

**cromatina** Complejo fibroso de ADN eucariota y proteínas histonas. Véase histonas, nucleosoma, y cromatosoma.

**cromatografía de afinidad de ADN** Método empleado para aislar proteínas de unión al ADN basado en su unión a secuencias específicas de ADN.

**cromatosoma** Subunidad de cromatina que consta de 166 pares de bases de ADN enrolladas alrededor de un núcleo de histona y mantenidas en su posición por un conector a la histona.

**cromoplasto** Plástido que contiene carotenoides.

**cromosoma artificial bacteriano (BAC)** Tipo de vector empleado en la clonación de fragmentos grandes de ADN en bacterias.

**cromosoma artificial de levadura (YAC)** Vector que puede ser replicado como un cromosoma en células de levadura y que puede acomodar inserciones muy grandes de ADN (de cientos de kb).

**cromosoma artificial P1 (PAC)** Vector empleado para la clonación de fragmentos grandes de ADN en *E. coli.*

**cromosoma politénico** Cromosoma gigante encontrado en algunos tejidos de *Drosophila* que surge de la replicación repetida de hebras de ADN que no se separan entre sí.

**cromosomas** Estructuras portadoras de los genes, consistentes en moléculas largas de ADN y proteínas asociadas.

**cuerpo basal** Estructura similar a un centriolo que inicia el crecimiento de los microtúbulos axonémicos y ancla los cilios y flagelos a la superficie de la célula.

**cuerpo polar** Célula pequeña formada por la división celular asimétrica que sigue a la meiosis de los oocitos.

**cultivos primarios** Cultivos celulares establecidos a partir de un tejido.

**decaimiento mediado por ARNm sin sentido** Degradación de ARNm que carecen de marcos de lectura abiertos completos.

**desmina** Una proteína de los filamentos intermedios expresada en células musculares.

**desmosoma** Región de contacto entre células epiteliales en la cual los filamentos de queratina se anclan a la membrana plasmática. Ver también hemidesmosoma.

**2'-desoxirribosa** Azúcar de cinco átomos de carbono que se encuentra en el ADN.

**diacilglicerol** Mensajero secundario formado por la hidrólisis de $PIP_2$, que activa la proteína quinasa C.

**diacinesis** Estadio final de la profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas se condensan por completo y la célula progresa a metafase.

***Dictyostelium discoideum*** Eucariota unicelular empleado para estudios de movimiento celular y señalización célula-célula.

**didesoxinucleótidos** Nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en 3' y que se emplean como nucleótidos terminadores de cadena en la secuenciación de ADN.

**difusión facilitada** Transporte de moléculas a través de una membrana mediante proteínas transportadoras o de canal.

**difusión pasiva** Difusión de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de una bicapa fosfolipídica.

**dímero de pirimidina** Forma común de lesión en el ADN causada por la luz UV donde las pirimidinas adyacentes se unen para formar un dímero.

**dineína** Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo negativo.

**dineína axonémica** Tipo de dineína que se encuentra en cilios y flagelos.

**dineína citoplásmica** Forma de la dineína que se asocia con los microtúbulos en el citoplasma.

**diploide** Organismo o célula que porta dos copias de cada cromosoma.

**diploteno** Estadio de la meiosis I donde los cromosomas homólogos se separan longitudinalmente pero permanecen asociados en el quiasma.

**distrofina** Proteína citoesquelética de las células musculares.

**dogma central** Concepto de que la información genética fluye de ADN a ARN y a proteínas.

**dolicol fosfato** Molécula lipídica del retículo endoplasmático sobre la que se unen los oligosacáridos para la glicosilación de las proteínas.

**dominante** Alelo que determina el fenotipo de un organismo cuando más de un alelo está presente.

**dominio apical** Superficie libre expuesta de una célula epitelial polarizada.

**dominio basolateral** Región superficial de una célula epitelial polarizada que está en contacto con células adyacentes o con la matriz extracelular.

**dominio de dedo de zinc** Tipo de dominio de unión de ADN constituido por bucles que contienen restos de cisteína e histidina, a los que se unen iones de zinc.

**dominio PTB** Dominio proteico que se une a los péptidos que contienen fosfotirosinas.

**dominio SH2** Dominio proteico de aproximadamente 100 aminoácidos que se une a péptidos que contienen fosfotirosina.

**dominios** Regiones compactas y globulares de las proteínas que son las unidades básicas de la estructura terciaria.

***Drosophila melanogaster*** Especie de mosca de la fruta comúnmente empleada para estudios de genética y desarrollo animal.

**E2F** Familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y la replicación del ADN.

**ecdisona** Hormona esteroidea de insectos que desencadena la metamorfosis.

**ectodermo** Capa externa germinal; da lugar a tejidos que incluyen la piel y el sistema nervioso.

**ecuación de Nernst** Relación entre concentración iónica y potencial de membrana.

**edición de ARN** Procesos de tratamiento del ARN distintos del splicing que alteran las secuencias de los ARMm que codifican proteínas.

**eicosanoide** Clase de lípidos, incluyendo prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos, y leucotrienos, que actúan en señalización autocrina y paracrina.

**elaioplastos** Plásticos que almacenan lípidos.

**elastina** Componente principal de las fibras elásticas.

**electroforesis en gel** Método en el que se separan moléculas en base a su migración en un campo eléctrico.

**electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida** Método comúnmente usado para la separación de proteínas por electroforesis en gel en función de su tamaño.

**electroporación** Introducción de ADN en células mediante su exposición a un breve pulso eléctrico.

**elemento de control que actúa en cis** Secuencia de ADN regulador que sirve de sitio de unión de proteínas y controla la transcripción de los genes adyacentes.

**elemento de respuesta al AMPc (CRE)** Secuencia reguladora que media la respuesta transcripcional de los genes diana al AMPc.

**elemento de respuesta al suero (SRE)** Secuencia reguladora que es reconocida por el factor de respuesta al suero y que media la inducción transcripcional de diversos genes inmediato-tempranos en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

**elemento semejante a un retrovirus** Retrotransposón que es estructuralmente similar a un retrovirus.

**elemento transponible** Véase transposón.

**Elk-1** Factor de transcripción que es activado por la fosforilación de ERK e induce la expresión de genes inmediatos-tempranos.

**encaje inducido** Modelo de acción enzimática en el que las configuraciones tanto de la enzima como del sustrato se modifican por la unión del sustrato.

**encefalina** Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.

**endocitosis** Entrada de material extracelular en vesículas formadas a partir de la membrana plasmática.

**endocitosis en fase fluida** Entrada no selectiva de fluidos extracelulares durante la endocitosis.

**endocitosis mediada por receptor** Entrada selectiva de macromoléculas que se unen a receptores de la superficie celular, que se concentran en depresiones revestidas por clatrina.

**endodermo** Capa interna germinal; da lugar a los órganos internos.

**endonucleasa AP** Enzima de reparación del ADN que corta en puntos próximos a sitios apirimidínicos o apurínicos en el ADN.

**endonucleasa de restricción** Enzima que corta el ADN en una secuencia específica.

**endorfina** Neuropéptido que actúa como un analgésico natural.

**endosoma** Compartimento vesicular implicado en la clasificación y transporte a los lisosomas del material tomado por endocitosis.

**endosimbiosis** Relación simbiótica en donde una célula reside en el interior de una célula mayor.

**energía de activación** Energía requerida para elevar una molécula a su estado de transición para llevar a cabo una reacción química.

**energía libre de Gibbs (G)** Función termodinámica que combina los efectos de la entalpía y la entropía para predecir la dirección energéticamente favorable de una reacción química.

**enfermedades del almacenamiento de los lisosomas** Familia de enfermedades caracterizadas por la acumulación de material sin degradar en los lisosomas de los individuos afectados.

**enlace fosfodiéster** Enlace entre el fosfato 5' de un nucleótido y el hidroxilo 3' de otro.

**enlace glicosídico** Enlace formado entre restos de azúcar en oligosacáridos o polisacáridos.

**enlace peptídico** Enlace que une aminoácidos en las cadenas polipeptídicas.

**enlaces de alta energía** Enlaces químicos que liberan una gran cantidad de energía libre cuando se hidrolizan.

**ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética** Ensayo para la unión de una proteína a una secuencia específica de ADN.

**entactina** Proteína de la matriz extracelular que interacciona con las lamininas y con el colágeno de tipo IV en la lámina basal.

**envoltura nuclear** Barrera que separa el núcleo del citoplasma, compuesta de una membrana interna y otra externa, una lámina nuclear y complejos de poro nuclear.

**enzimas** Proteínas o ARNs que catalizan reacciones biológicas.

**ErbA** Protooncogén que codifica un receptor de la hormona tiroidea.

***erb*B-2** Protooncogén que codifica un receptor proteína tirosina-quinasa que frecuentemente está amplificado en los carcinomas mamario y ovárico.

**eritrocitos** Glóbulos rojos sanguíneos.

**ERK** Miembro de la familia de las quinasas MAP que juega un papel central en la proliferación celular inducida por factores de crecimiento.

***Escherichia coli*** **(*E. coli*)** Especie de bacterias que ha sido ampliamente utilizada como sistema modelo para la biología molecular.

**escinucleasa** Complejo proteico que escinde el ADN dañado durante la reparación por escisión de nucleótidos en bacterias.

**esfingomielina** Fosfolípido constituido por dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene serina.

**espectrina** Una de las principales proteínas de fijación de la actina del córtex celular.

**espliceosomas** Complejos grandes de ARNsn y proteínas que catalizan el *splicing* de pre-ARNm.

**estado de transición** Estado energético elevado a través del cual deben pasar los sustratos durante el curso de una reacción enzimática.

**ésteres de forbol** Clase de promotores de tumores que estimulan a la proteína quinasa C al actuar como análogos del diacilglicerol.

**estereocilio** Microvellosidad especializada de las células auditivas.

**estimulación autocrina del crecimiento** Estimulación de la proliferación celular como resultado de la producción de un factor de crecimiento por parte de una célula que responde a dicho factor.

**estrógeno** Hormona esteroidea producida por los ovarios.

**estroma** Compartimento de los cloroplastos que se encuentra entre la envuelta y la membrana tilacoidea.

**etileno** Hormona vegetal responsable de la maduración de la fruta.

**etioplasto** stadio intermedio del desarrollo del cloroplasto en el que la clorofila no se ha sintetizado.

**estructura cuaternaria** Interacciones entre cadenas polipeptídicas en las proteínas que están constituidas por más de un polipéptido.

**estructura primaria** Secuencia de aminoácidos en una cadena polipeptídica.

**estructura secundaria** Disposición regular de los aminoácidos dentro de regiones localizadas de una cadena polipeptídica. Ver $\alpha$-hélice y lámina $\beta$.

**estructura terciaria** Pliegue tridimensional de una cadena polipeptídica que confiere a la proteína su forma funcional.

**eubacterias** Uno de los dos grupos principales de procariotas, incluyendo las especies más comunes de bacterias.

**eucromatina** Cromatina interfásica descondensada y transcripcionalmente activa.

**exón** Segmento de un gen que contiene una secuencia codificante.

**exonucleasa** Enzima que hidroliza moléculas de ADN tanto en dirección 5' a 3' como 3' a 5'.

**exportina** Receptor proteico que reconoce señales de exportación nuclear y dirige el transporte desde el núcleo al citosol.

**expresión transitoria** Expresión de ADN plasmídico no integrado que se ha introducido en células cultivadas.

**FAK (quinasa de adhesión focal)** Proteína-tirosina quinasa no receptora que desempeña un papel clave en la señalización de las integrinas.

**factor citostático (CSF)** Factor citoplásmico que detiene la meiosis del oocito en la metafase II.

**factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** Factor de crecimiento liberado desde las plaquetas en la coagulación sanguínea para estimular la proliferación de los fibroblastos.

**factor de crecimiento epidérmico (EGF)** Factor de crecimiento que estimula la proliferación celular.

**factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF-$\beta$)** Factor de crecimiento polipeptídico que generalmente inhibe la proliferación de las células animales.

**factor de elongación** Proteína implicada en la fase de elongación de la transcripción o traducción.

**factor de liberación** Proteína que reconoce a los codones de terminación y finaliza la traducción del ARNm.

**factor de necrosis tumoral (TNF)** Factor de crecimiento polipeptídico que induce a la muerte celular programada.

**factor de respuesta al suero (SRF)** Factor de transcripción que se une al elemento de respuesta al suero.

**factor de transcripción** Proteína que regula la actividad de la ARN polimerasa.

**factor promotor de maduración (MPF)** Complejo de Cdc2 y ciclina B que promueve la entrada en la fase M, tanto de la mitosis como de la meiosis.

**factores asociados a TBP (TAFs)** Polipéptidos asociados con TBP en el factor de transcripción general TFIID.

**factores de crecimiento** Polipéptidos que controlan el crecimiento de la célula animal y su diferenciación.

**factores de crecimiento anclados a la membrana** Factores de crecimiento asociados a la membrana plasmática que actúan como moléculas de señalización durante el contacto célula-célula.

**factores de crecimiento neuronales (NGF)** Factor de crecimiento polipeptídico que regula el desarrollo y supervivencia de las neuronas.

**factores de remodelación del nucleosoma** Proteínas que alteran la estructura de la cromatina, permitiendo a los factores de transcripción unirse al ADN nucleosomal.

**factores de transcripción generales** Factores de transcripción que forman parte de la maquinaria general de transcripción.

**factores *trans*-activadores** Proteínas reguladoras de la transcripción.

**fagocitosis** Entrada de partículas grandes, como bacterias, a la célula.

**fagolisosoma** Lisosoma que se ha fusionado con un fagosoma o un autofagosoma.

**fagosoma** Vacuola que contiene una partícula internalizada por fagocitosis.

**faloidina** Fármaco que se fija a los filamentos de actina y previene su desensamblaje.

**familia génica** Grupo de genes relacionados que han surgido a partir de la duplicación de un ancestro común.

**fase $G_1$** Fase del ciclo celular entre el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN.

**fase $G_2$** Fase del ciclo celular entre el final de la fase S y el comienzo de la mitosis.

**fase M** Fase mitótica del ciclo celular.

**fase S** Fase del ciclo celular durante la cual se produce la replicación del ADN.

**fenotipo** Apariencia física de un organismo.

**fibras elásticas** Fibras proteicas que están presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos en órganos que se deforman y después vuelven a su forma original.

**fibras musculares** Células grandes del músculo esquelético, que se forman por la fusión de muchas células individuales durante el desarrollo.

**fibrillas de colágeno** Fibrillas formadas por el ensamblaje de moléculas de colágeno en una organización escalonada regular.

**fibroblasto** Tipo de célula que se encuentra en el tejido conectivo.

**fibronectina** Principal proteína de adhesión de la matriz extracelular.

**fijación de nitrógeno** Reducción del nitrógeno atmosférico ($N_2$) a $NH_3$.

**filamento intermedio** Filamento citoesquelético de aproximadamente 10 nm de diámetro que proporciona fuerza mecánica a las células en los tejidos. Véase también queratinas y neurofilamentos.

**filamina** Proteína de unión a la actina que entrelaza filamentos de actina para formar redes.

**filopodio** Proyección delgada de la membrana plasmática soportada sobre haces de actina.

**flagelo** Proyección con base microtubular de la membrana plasmática que es responsable de movimiento celular.

**flavín adenín dinucleótido ($FADH_2$)** Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.

**flujo electrónico cíclico** Ruta de transporte electrónico asociada al fotosistema I que produce ATP sin la síntesis de NADPH.

**fodrina** Espectrina no eritroide.

**Fos** Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es inducido en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

**fosfatidilcolina** Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la colina.

**fosfatidiletanolamina** Fosfolípido del glicerol cuya cabeza está formada a partir de la etanolamina.

**fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa)** Componente fosfolipídico secundario de la cara interna de la membrana plasmática. Las hormonas y los factores de crecimiento estimulan su hidrólisis mediante la fosfolipasa C, dando lugar a segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol trifosfato.

**fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ($PIP_2$)** Componente fosfolipídico menor de la parte interna de la membrana plasmática. Las hormonas y factores de crecimiento estimulan su hidrólisis por fosfolipasa c, produciendo los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato.

**fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ($PIP_3$)** Segundo mensajero formado por la fosforilación de $PIP_2$.

**fosfatidilserina** Fosfolípido del glicerol con una cabeza formada a partir de la serina.

**fosfolipasa C** Enzima que hidroliza $PIP_2$ para formar los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato.

**fosfolípidos** Componentes principales de las membranas celulares, que constan de dos cadenas hidrocarbonadas (generalmente ácidos grasos) unidas a una cabeza polar que contiene fosfato.

**fosforilación** Adición de un grupo fosfato a una molécula.

**fosforilación oxidativa** Síntesis de ATP a partir del ADP, que está acoplada a la transferencia, energéticamente favorable, de electrones a un oxígeno molecular. Éste actúa como aceptor final en una cadena de transporte electrónico.

**fotorreactivación** Mecanismo de reparación del ADN donde se emplea energía solar para escindir los dímeros de pirimidina.

**fotosíntesis** Proceso mediante el cual las células aprovechan la energía de la luz solar y sintetizan glucosa a partir de $CO_2$ y agua.

**fotosistema I** Complejo proteico de la membrana del tilacoide que emplea la energía absorbida de la luz solar para sintetizar NADPH.

**fotosistema II** Complejo proteico en la membrana del tilacoide que usa la energía absorbida de la luz solar para sintetizar ATP.

**fragmentos de Okazaki** Fragmentos cortos de ADN que se unen para formar la hebra retrasada de ADN.

**$G_0$** Estado de reposo en el que las células permanecen metabólicamente activas pero no proliferan.

**gen** Segmento de ADN que codifica una cadena polipeptídica o una molécula de ARN.

**gen supresor de tumores** Gen cuya inactivación conduce al desarrollo de un tumor.

**genes inmediato-tempranos** Familia de genes cuya transcripción es inducida rápidamente en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

**genética inversa** Análisis de la función génica por la introducción de mutaciones en un gen clonado.

**genotipo** Composición genética de un organismo.

**giberelina** Hormona vegetal.

**glioxisoma** Peroxisomas en los que tienen lugar las reacciones del ciclo del glioxilato.

**glicerol fosfolípidos** Fosfolípidos que consisten en dos ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.

**glicocálix** Revestimiento carbohidratado que recubre la superficie celular.

**glicolípido** Lípido que consta de dos cadenas hidrocarbonadas unidas a una cabeza polar que contiene carbohidratos.

**glicoproteína** Proteína unida a oligosacáridos.

**glicosaminoglicano (GAG)** Polisacárido de la matriz extracelular, constituyente de geles.

**glicosilación** Adición de carbohidratos a las proteínas.

**glucocorticoide** Esteroide producido por la glándula adrenal que actúa para estimular la producción de glucosa.

**glucógeno** Polímero de restos de glucosa que es la principal fuente de almacenamiento de carbohidratos en los animales.

**glucolisis** Degradación anaeróbica de glucosa.

**gluconeogénesis** Síntesis de glucosa.

**GMP cíclico (GMPc)** Guanosina monofosfato donde el grupo fosfato está covalentemente unido a los átomos de carbono 3' y 5', formando una estructura cíclica; importante segundo mensajero en la respuesta de las células a una variedad de hormonas y en la visión.

**GMPc fosfodiesterasa** Enzima que degrada GMPc.

**gradiente electroquímico** Diferencia en la concentración química y en el potencial eléctrico a través de una membrana.

**granulocitos** Células sanguíneas que están implicadas en reacciones inflamatorias.

**grasas** Véase triacilgliceroles.

**grupos prostéticos** Pequeñas moléculas unidas a las proteínas.

**guanina** Purina que se empareja con citosina.

**guanilato ciclasa** Enzima que cataliza la formación de GMP cíclico a partir de GTP.

**haces contráctiles** Haces de filamentos de actina que interaccionan con la miosina II y son capaces de contracción.

**haploide** Organismo o célula que presenta una copia de cada cromosoma.

**haz de actina** Filamentos de actina que se entrecruzan en formaciones densamente empaquetadas.

**hebra directora** Hebra del ADN sintetizada de forma continua en la dirección de avance de la horquilla de replicación.

**hebra retrasada** Hebra del ADN sintetizada de forma opuesta a la dirección de avance de la horquilla de replicación, mediante la unión de los fragmentos de Okazaki.

**helicasa** Enzima que cataliza el enrollamiento del ADN.

**hélice-giro-hélice** Dominio de unión al ADN de un factor de transcripción en el que tres o cuatro regiones en hélice contactan con el ADN.

**hélice-lazo-hélice** Dominio de unión a ADN de un factor de transcripción formado por la dimerización de dos cadenas polipeptídicas. Los dominios de dimerización de estas proteínas consisten en dos regiones en hélice separadas por un lazo.

**hemicelulosa** Polisacárido que entrelaza microfibrillas de celulosa en las paredes celulares vegetales.

**hemidesmosoma** Región de contacto entre células y la matriz extracelular donde los filamentos de queratina se unen a la integrina.

**hendidura revestida de clatrina** Región especializada de la superficie de las membranas celulares que contiene receptores para macromoléculas que deben internalizarse por mitosis.

**herpesvirus** Familia de virus de ADN, algunos de cuyos miembros inducen cáncer.

**herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi** Herpesvirus humano que causa el sarcoma de Kaposi.

**heterocromatina** Cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva.

**hibridación de los ácidos nucleicos** Formación de moléculas de doble hebra de ADN y/o ARN por apareamiento de bases complementarias.

**hibridación fluorescente in situ (FISH)** Método empleado para localizar genes en los cromosomas, empleando sondas fluorescentes.

**hibridación *in situ*** Uso de sondas radioactivas o fluorescentes para detectar secuencias de ARN o ADN en extractos celulares, cromosomas, o células intactas.

**hidrofílico** Soluble en agua.

**hidrofóbico** No soluble en agua.

**hipótesis SNARE** Hipótesis de que la fusión vesicular está mediada por pares de proteínas transmembrana (SNAREs) en las membranas vesicular y diana.

**histonas** Proteínas que empaquetan el ADN en los cromosomas eucariotas.

**hoja $\beta$** Estructura secundaria en forma de lámina de una cadena polipeptídica, formada por enlaces de hidrógeno entre aminoácidos localizados en diferentes regiones del polipéptido.

**homeobox** (caja homeótica) Secuencias de ADN conservadas de 180 pares de bases que codifican los homeodominios.

**homeodominio** Tipo de dominio, de unión al ADN, que se encuentra en los factores de transcripción que regulan la expresión génica durante el desarrollo embrionario.

**hormona peptídica** Molécula señalizadora compuesta por aminoácidos.

**hormona tiroidea** Hormona sintetizada a partir de la tirosina en la glándula tiroides.

**hormonas** Moléculas de señalización producidas por las glándulas endocrinas que actúan sobre células en lugares distantes del cuerpo.

**hormonas esteroideas** Grupo de hormonas hidrofóbicas que derivan del colesterol.

**hormonas vegetales** Grupo de pequeñas moléculas que coordinan las respuestas de los tejidos vegetales a las señales medioambientales.

**horquilla de replicación** Región de la síntesis del ADN donde las hebras parentales se separan y crecen dos nuevas hebras hijas.

**huso mitótico** Formación de microtúbulos que se extienden desde los polos del huso y que es responsable de la separación de los cromosomas hermanos durante la mitosis. Véase también microtúbulos cinetocóricos, microtúbulos polares y microtúbulos astrales.

**importina** Receptor proteico que reconoce señales de localización nuclear y dirige la importación nuclear.

**impronta genómica** Regulación de los genes cuya expresión depende de si han sido heredados por parte de la madre o del padre, aparentemente regulada por la metilación del ADN.

**inactivación del cromosoma X** Mecanismo de compensación de la dosis en el que la mayoría de los genes de uno de los cromosomas X se inactivan en las células femeninas.

**inestabilidad dinámica** Alternación de los microtúbulos entre ciclos de crecimiento y degradación.

**inhibición de contacto** Inhibición del movimiento o de la proliferación de células normales como resultado de un contacto célula-célula.

**inhibición dependiente de la densidad** Cese de la proliferación de células normales en cultivo a una determinada densidad celular.

**inhibición por retroalimentación** Tipo de regulación alostérica en donde el producto de una ruta metabólica inhibe la actividad de una enzima implicada en su síntesis.

**inhibidor de Cdk (CKI)** Familia de proteínas que fijan Cdks e inhiben su actividad.

**iniciación tumoral** Primer paso en el desarrollo de un tumor, resultante de la proliferación anormal de una sola célula.

**inmunoglobulina** Véase anticuerpo.

**inmunoprecipitación** Empleo de anticuerpos para aislar proteínas.

**inmunotinción** Método que emplea anticuerpos para detectar proteínas que han sido separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

**inositol 1,4,5-trifosfato ($IP_3$)** Segundo mensajero, formado por la hidrólisis de $PIP_2$, que señala la liberación de iones de calcio desde el retículo endoplasmático.

**integrina** Proteína transmembrana que interviene en la adhesión de las células a la matriz extracelular.

**interacción heterofílica** Interacción entre dos tipos diferentes de moléculas de adhesión celular.

**interacción homofílica** Interacción entre moléculas de adhesión celular del mismo tipo.

**intercambio rotatorio** Comportamiento dinámico de los filamentos de actina y los microtúbulos, en el que la pérdida de subunidades en un extremo del filamento se equilibra por su adición en el otro extremo.

**interfase** Período del ciclo celular entre dos mitosis que incluye las fases $G_1$, S, y $G_2$.

**interferencia de ARN (ARNi)** Degradación del ARNm por moléculas de ARN cortas, de doble hebra y homólogas.

**intrón** Secuencia no codificante que interrumpe los exones en un gen.

**Jun** Factor de transcripción, codificado por un protooncogén, que es activado en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento.

**kilobase (kb)** Mil nucleótidos o pares de bases de nucleótidos.

**lamela media** Región de la pared celular vegetal que actúa como pegamento para mantener unidas las células adyacentes.

**lamelipodio** Amplia extensión de la membrana plasmática, formada a partir de actina, que está implicada en el movimiento de los fibroblastos.

**lámina basal** Matriz extracelular en forma de lámina que soporta las células epiteliales y rodea las células musculares, células adiposas, y nervios periféricos.

**lámina nuclear** Malla de filamentos laminares que proporciona un soporte estructural al núcleo.

**láminas** Proteínas de los filamentos intermedios que forman la lámina nuclear.

**laminina** Principal proteína de adhesión de la lámina basal.

**leptoteno** Estadio inicial de la larga profase de la meiosis I durante la cual los cromosomas homólogos se emparejan después de la condensación.

**leucemia** Cáncer que aparece en los precursores de las células sanguíneas circulantes.

**leucoplasto** Plástido que almacena fuentes de energía en tejidos vegetales no fotosintéticos.

**levaduras** Los eucariotas unicelulares más simples. Las levaduras son modelos importantes para los estudios de las células eucariotas.

**ligando** Molécula que se une a un receptor.

**lignina** Polímero de restos fenólicos que fortalece las paredes celulares secundarias.

**líneas celulares** Células que pueden proliferar indefinidamente en cultivo.

**LINEs (*long interspersed elements*)** Familia de retrotransposones altamente repetidos en el genoma de los mamíferos.

**linfocito** Célula sanguínea que actúa en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B producen anticuerpos y los linfocitos T son responsables de la inmunidad mediada por células.

**linfoma** Cáncer de células linfoides.

**lipoproteína de baja densidad (LDL)** Partícula de lipoproteína que transporta colesterol en la circulación.

**liposoma** Vesícula lipídica empleada para introducir ADN en las células de mamífero.

**lisogenia** Infección viral que conduce a la integración de una copia inactiva de ADN vírico en el genoma celular.

**lisosoma** Orgánulo citoplasmático que contiene enzimas que destruyen polímeros biológicos.

**macrófago** Clase de glóbulo blanco sanguíneo especializado en la fagocitosis.

**macropinocitosis** Ingesta de fluidos en grandes vesículas.

**MAP quinasas** Familia de proteína-serina/treonina quinasas activadas por mitógeno que son reguladores ubicuos del crecimiento y diferenciación celular.

**mapa de restricción** Localización de los sitios de corte de la endonucleasa de restricción en una molécula de ADN.

**marco de lectura abierto** Secuencia de nucleótidos que no contiene codones de detención y puede codificar un polipéptido.

**material pericentriolar** Material en el centrosoma que inicia el ensamblaje de los microtúbulos.

**matriz** Espacio interno mitocondrial.

**matriz extracelular** Proteínas y polisacáridos secretados que rellenan los espacios entre las células y que une las células y los tejidos entre sí.

**mediador** Complejo de proteínas que permite que los genes codificadores de proteínas respondan a los factores reguladores gen-específicos.

**megabase (Mb)** Un millón de nucleótidos o de pares de bases de nucleótidos.

**meiosis** División de células diploides en una progenie haploide, consistente en dos rondas secuenciales de división nuclear y celular.

**membrana de basamento** Véase lámina basal.

**membrana plasmática** Bicapa fosfolipídica con proteínas asociadas que rodea la célula.

**membrana del tilacoide** Membrana más interna de los cloroplastos y que es el sitio donde tiene lugar el transporte electrónico y la síntesis de ATP.

**membranas nucleares** Membranas que forman la envuelta nuclear; la membrana nuclear externa continúa por el retículo endoplasmático y la membrana nuclear interna es adyacente a la lámina nuclear.

**mesodermo** Capa media germinal; da lugar a los tejidos conectivos y al sistema hematopoyético.

**metabolismo oxidativo** Empleo del oxígeno molecular como aceptor de electrones en la degradación de moléculas orgánicas.

**metafase** Fase de la mitosis durante la cual los cromosomas se alinean en la placa metafásica en el centro de la célula.

**metástasis** Propagación de las células cancerígenas desde la sangre o el sistema linfático a otros lugares del organismo.

***microarray* de ADN** Portaobjetos de cristal o un filtro sobre el que se imprimen oligonucleótidos o fragmentos de ADNc con una elevada densidad, permitiendo el análisis simultáneo de miles de genes mediante hibridación del *microarray* con sondas fluorescentes.

**microfibrillas de celulosa** Fibras de las paredes celulares vegetales que se forman por la asociación de varias docenas de cadenas paralelas de celulosa.

**microfilamento** Filamento citoesquelético compuesto de actina.

**microscopía confocal** Forma de microscopía en la que se combina la microscopía de fluorescencia con el análisis electrónico de la imagen para obtener imágenes con un contraste y detalle elevados.

**microscopía de campo claro** Forma más sencilla de microscopía lumínica, en la que la luz pasa directamente a través de una célula.

**microscopía de contraste de fases** Tipo de microscopía en el que las variaciones en la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.

**microscopía de contraste por interferencia diferencial** Tipo de microscopía en el que las variaciones de la densidad o el grosor entre partes de la célula se convierten en diferencias de contraste en la imagen final.

**microscopía de excitación multifotónica** Forma de microscopía de fluorescencia en la que la muestra es iluminada con una luz de longitud de onda tal que la excitación del colorante fluorescente requiere de la absorción simultánea de dos o más fotones.

**microscopía de fluorescencia** Tipo de microscopía en el que las moléculas son detectadas en base a la emisión de luz fluorescente.

**microscopía electrónica** Tipo de microscopía que emplea un rayo de electrones para formar una imagen. En la microscopía electrónica de transmisión, un rayo de electrones pasa a través de una muestra marcada con metales pesados. En la microscopía electrónica de barrido, los electrones dispersados por la superficie de la muestra se analizan para generar una imagen tridimensional.

**microscopía electrónica de barrido** Véase microscropía electrónica.

**microscopía electrónica de transmisión** Véase microscopía electrónica.

**microscopía favorecida por video** Uso combinado de cámaras de video con microscopía lumínica para permitir la visualización de objetos pequeños.

**micropúa** Véase filopodio.

**microsoma** Pequeña vesícula formada por el retículo endoplásmico cuando las células se rompen.

**microtúbulo** Componente citoesquelético formado por la polimerización de la tubulina dando lugar a segmentos rígidos y huecos de aproximadamente 25 nm de diámetro.

**microtúbulos astrales** Microtúbulos del huso mitótico que se extienden a la periferia celular.

**microtúbulos cinetocóricos** Microtúbulos del huso mitótico que fijan los cromosomas condensados a sus centrómeros.

**microtúbulos polares** Microtúbulos del huso mitótico que se solapan en el centro de la célula y que empujan a los polos del huso para separarlos.

**microvellosidad** Extensión de la membrana plasmática, basada en la actina, abundante en las superficies de las células implicadas en la absorción.

**mineralocorticoides** Hormonas esteroídicas producidas por la glándula adrenal que actúan sobre el riñón para regular el equilibrio de sales y agua.

**miofibrilla** Haz de filamentos de actina y miosina en las células musculares.

**miosina** Proteína que interacciona con la actina como motor molecular.

**miosina I** Tipo de miosina que actúa para transportar mercancías a lo largo de los filamentos de actina.

**miosina II** Tipo de miosina que produce la contracción mediante el deslizamiento de filamentos de actina.

**mitocondria** Orgánulo citoplasmático responsable de la síntesis de la mayoría del ATP de las células eucariotas mediante fosforilación oxidativa.

**mitosis** División nuclear.

**modelo de cerradura y llave** Modelo de acción enzimática en el que el sustrato encaja con precisión en el centro activo de la enzima.

**modelo de mosaico fluido** Modelo de estructura de la membrana donde las proteínas se insertan en una bicapa fluida fosfolipídica.

**modelo del filamento deslizante** Modelo de contracción muscular en el que la contracción resulta del deslizamiento de los filamentos de actina y miosina, uno respecto del otro.

**modelo Holliday** Un modelo molecular de recombinación genética que implica la formación de regiones heterodúplex.

**moléculas de adhesión celular** Proteínas transmembrana que intervienen en las interacciones célula-célula.

**molécula recombinante** Fragmento de ADN unido a un vector.

**monocistrónico** ARN mensajero que codifica una única cadena polipeptídica.

**monolito** Tipo de célula sanguínea implicada en las reacciones inflamatorias.

**monosacáridos** Azúcares simples con la fórmula básica de $(CH_2O)_n$.

**Mos** Proteína quinasa necesaria para la progresión desde la meiosis I hasta la meiosis II y el mantenimiento de la detención en metafase II en los oocitos de vertebrados.

**motor molecular** Proteína que genera fuerza y movimiento mediante la conversión de energía química en energía mecánica.

**muerte celular programada** Forma fisiológica normal de muerte celular caracterizada por la apoptosis.

**mundo ARN** Estadio temprano de la evolución basado en moléculas autorreplicantes de ARN.

**mutación** Alteración genética.

**mutagénesis *in vitro*** Introducción de mutaciones en un ADN clonado *in vitro*.

**mutágeno** Producto químico que induce una alta frecuencia de mutaciones.

**mutante inhibidor dominante** Mutante que interfiere con la función del alelo normal del gen.

**mutante sensible a temperatura** Célula que expresa una proteína que es funcional a una temperatura pero no a otra, mientras que la proteína normal es funcional a ambas temperaturas.

**NADP reductasa** Enzima que transfiere electrones de la ferrodoxina al $NADP^+$, dando NADPH.

**nebulina** Proteína que regula la longitud de los filamentos de actina en las células musculares.

**neurofilamento** Clase de filamento intermedio que sostiene los axones de las células nerviosas.

**neurohormona** Péptidos que son secretados por las neuronas y que actúan sobre células distantes.

**neurona** Célula nerviosa especializada en recibir y transmitir señales por todo el cuerpo.

**neuropéptidos** Moléculas señalizadoras peptídicas secretadas por las neuronas.

**neurotransmisor** Pequeña molécula hidrofílica que transporta una señal desde una neurona estimulada a una célula diana en una sinapsis.

**neurotrofina** MMMMMiembro de una familia de polipéptidos que regula el desarrollo y supervivencia neuronal.

**nexina** Proteína que une dobletes de microtúbulos entre sí en el axonema.

**nicotinamida-adenina dinucleótido ($NAD^+$)** Coenzima que actúa como transportador electrónico en reacciones de oxidación/reducción.

**nidogén** Véase entactina.

**N-miristoilación** Adición de ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) al resto de glicina N-terminal de una cadena polipeptídica.

**N-*myc*** Protooncogén que codifica un factor de transcripción y es activado con frecuencia por la amplificación de neuroblastomas.

**núcleo** Orgánulo más prominente de las células eucariotas; contiene el material genético.

**nucleolo** Sitio nuclear de transcripción y procesamiento del ARNr, y ensamblaje de los ribosomas.

**nucleósido** Base de purina o pirimidina unida a un azúcar (ribosa o desoxirribosa).

**nucleosoma** Unidad básica estructural de cromatina que consiste en ADN enrollado alrededor de un núcleo de histona.

**nucleótido** Nucleósido fosforilado.

**oligonucleótido** Polímero corto de sólo unos pocos nucleótidos.

**oligosacárido** Polímero corto de sólo unos pocos azúcares.

**oncogén** Gen capaz de inducir una o más características de las células cancerígenas.

**operador** Secuencia reguladora de ADN que controla la transcripción de un operón.

**operón** Grupo de genes adyacentes transcritos como un único ARNm.

**organizador celular activado por fluorescencia** Instrumento que organiza las células individuales en base a su intensidad de fluorescencia.

**origen de replicación** Secuencia específica de ADN que actúa como sitio de unión para las proteínas que inician la replicación.

**p53** Factor de transcripción (codificado por el gen supresor de tumores p53) que detiene el ciclo celular en $G_1$ en respuesta a un ADN dañado y que se requiere para la apoptosis inducida por diferentes estímulos.

**papilomavirus** Miembro de la familia de virus de ADN, algunos de los cuales causan cáncer cervical y otros cánceres anogenitales en el hombre.

**paquiteno** Estadio de meiosis I durante el cual tiene lugar la recombinación entre los cromosomas homólogos.

**palmitoilación** Adición de ácido palmítico (un ácido graso de 16 carbonos) a restos de cisteína de una cadena polipeptídica.

**pared celular** Estructura rígida y porosa que forma una capa externa y proporciona soporte estructural a bacterias, hongos, y células vegetales.

**pared celular secundaria** Pared celular gruesa que se encuentra entre la membrana plasmática y la pared celular primaria de las células vegetales que han cesado su crecimiento.

**paredes celulares primarias** Paredes de células vegetales en crecimiento.

**partícula de reconocimiento de la señal (SRP)** Partícula compuesta de proteínas y de ARN 7SL que se une a las secuencias de señalización y dirige las cadenas polipeptídicas al retículo endoplásmico.

**partículas de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn)** Complejos de ARNsn con proteínas.

**partículas del centro del nucleosoma** Partículas que contienen 146 pares de bases de ADN asociados en torno a un núcleo de histonas.

**peptidasa de señalización** Enzima que retira la secuencia de señalización de una cadena polipeptídica por proteolisis.

**peptidasa procesadora de la matriz (MPP)** Proteasa que escinde presecuencias de las proteínas internalizadas en la matriz mitocondrial.

**peptidasa procesadora estromal (SPP)** Proteasa que escinde a los péptidos de tránsito de las proteínas internalizadas en el estroma del cloroplasto.

**péptidos de transición** Secuencias N-terminales que dirigen a las proteínas para su internalización en el cloroplasto.

**pectina** Polisacárido formador de geles de las paredes celulares vegetales.

**peptidil prolil isomerasa** Enzima que facilita el pliegue de las proteínas mediante la catalización de la isomerización cis-trans de los enlaces prolil peptídicos.

**peptidoglicano** Componente principal de las paredes celulares bacterianas constituido por cadenas polisacáridas lineales entrelazadas mediante péptidos cortos.

**peroxisoma** Orgánulo citoplasmático especializado en llevar a cabo reacciones oxidativas.

**pez cebra** Especie de pez pequeño empleado para estudios genéticos del desarrollo de los vertebrados.

**pigmentos fotosintéticos** Moléculas que capturan la energía de los rayos solares absorbiendo fotones.

**pinocitosis** Entrada de fluidos o moléculas al interior de una célula mediante vesículas pequeñas.

**placa celular** Estructura discoide rodeada por membrana que forma nuevas paredes celulares durante la citocinesis de las plantas superiores.

**plaquina** Miembro de una familia de proteínas que asocia los filamentos intermedios con otras estructuras celulares.

**plasmalógenos** Familia de fosfolípidos que tienen enlace éter y enlace éster.

**plásmido** Molécula pequeña de ADN circular capaz de replicarse de forma independiente en una célula hospedadora.

**plásmido Ti** Plásmido empleado para la transferencia génica en plantas.

**plasmodesmo** Conexión citoplasmática entre células vegetales adyacentes que está formada por una región continua de membrana plasmática.

**plastos** Familia de orgánulos vegetales que incluye a los cloroplastos, cromoplastos, leucoplastos, amiloplastos, y elaioplastos.

**PML/RAR$\alpha$** Oncogén formado por la translocación del receptor del ácido retinoico en la leucemia aguda promielocítica.

**poliadenilación** proceso de adición de una cola de poli-A a un pre-ARNm.

**policistrónico** ARN mensajero que codifica múltiples cadenas polipeptídicas.

**polinucleótido** Polímero que contiene millones de nucleótidos.

**poliomavirus** Virus de ADN tumoral ampliamente estudiado.

**polipéptido** Polímero de aminoácidos.

**pólipo** Tumor benigno que se extiende por una superficie epitelial.

**polisacárido** Polímero que contiene cientos o miles de azúcares.

**polisoma** Serie de ribosomas que traducen un ARN mensajero.

**porina** Miembro de una clase de proteínas que atraviesan las membranas como barriles-$\beta$ y forman canales en las membranas externas de algunas bacterias, mitocondrias y cloroplastos.

**potenciador** (Referido a «enhancer», «secuencia activadora» o «secuencia intensificadora».) Secuencia reguladora de la transcripción que puede localizarse en un sitio distante del promotor.

**potencial de acción** Impulsos nerviosos que viajan a lo largo de los axones.

**pre-ARNm** Transcritos primarios que se procesan para formar ARNs mensajeros en las células eucariotas.

**pre-ARNr** Transcritos primarios que se cortan para dar lugar a ARNs ribosómicos individuales (los ARNrs 28S, 18S y 5,8S de las células eucariotas).

**pre-ARNt** Transcritos primarios que se cortan para formar ARNs de transferencia.

**prenilación** Adición de tipos específicos de lípidos (grupos prenilo) a restos de cisteína C-terminales de una cadena polipeptídica.

**presión de turgencia** Presión interna hidrostática en el interior de las células vegetales.

**primasa** ARN polimerasa usada para iniciar la síntesis de ADN.

**procolágenos** Precursores solubles de los colágenos formadores de fibrillas.

**producto** Compuesto formado como resultado de una reacción enzimática.

**profase** Fase inicial de la mitosis, marcada por la aparición de los cromosomas condensados y el desarrollo del huso mitótico.

**profilina** Proteína de unión a la actina que estimula el ensamblaje de monómeros de actina en filamentos.

**progesterona** Hormona esteroidea producida por los ovarios.

**progresión tumoral** Acumulación de mutaciones en el interior de células de una población tumoral, resultando en un crecimiento acelerado y malignidad.

**prometafase** Periodo de transición entre la profase y la metafase durante la cual los microtúbulos del huso mitótico se unen a los cinetocoros y los cromosomas se mueven de un lado a otro hasta que son alineados en el centro de la célula.

**promotor** Secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

**promotor tumoral** Compuesto que conduce al desarrollo tumoral mediante la estimulación de la proliferación celular.

**pronúcleo** Dos núcleos haploides en un nuevo huevo fecundado.

**prostaciclina** Eicosanoide formado a partir de la prostaglandina $H_2$.

**prostaglandina** Familia de lípidos eicosanoides implicados en la señalización de la inflamación.

**proteína de fijación a TATA (TBP)** Factor de transcripción basal que se une de forma directa a la caja TATA.

**proteína de fluorescencia verde (GFP)** Proteína de medusa que se emplea comúnmente como marcador en la microscopía de fluorescencia.

**proteína de transferencia de fosfolípidos** Proteína que transporta moléculas fosfolipídicas entre membranas celulares.

**proteína disulfuro isomerasa** Enzima que cataliza la formación y rotura de los puentes disulfuro (S-S).

**proteína-G** Familia de proteínas de señalización celular reguladas por la unión del nucleótido guanina.

**proteína G heterotrimérica** Proteína de unión a nucleótidos de guanina que consiste en tres subunidades.

**proteína quinasa** Enzima que fosforila proteínas mediante la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP.

**proteína quinasa A** Proteína quinasa regulada por el AMP cíclico.

**proteína quinasa C** Familia de proteína-serina/treonina quinasas que se activan con diacilglicerol y $Ca^{2+}$ y actúan en la transducción intracelular de señales.

**proteína fosfatasa** Enzima que revierte la acción de las proteínas quinasas mediante la retirada de los grupos fosfatos desde restos de aminoácidos fosforilados.

**proteína quinasa AMPc-dependiente** Véase proteína quinasa A.

**proteína-serina/treonina quinasa** Proteína quinasa que fosforila restos de serina y treonina.

**proteína-tirosina fosfatasa** Enzima que retira los grupos fosfato desde restos de fosfotirosina.

**proteína-tirosina quinasa** Proteína quinasa que fosforila restos de tirosina.

**proteína-tirosina quinasa no receptora** Proteína tirosina quinasa intracelular.

**proteína-tirosina quinasa receptora** Proteína-tirosina quinasa asociada a la membrana que es receptora de ligandos extracelulares.

**proteínas** Polipéptidos con una única secuencia aminoacídica.

**proteínas activadoras de la GTPasa** Proteínas que estimulan la hidrólisis de GTP por parte de las proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP.

**proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs)** Proteínas que se unen a los microtúbulos y modifican su estabilidad.

**proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP** Gran familia de proteínas monoméricas de unión a GTP, incluyendo las proteínas Ras, Rab, Rho y Ran.

**proteínas de canal** Proteínas que forman poros a través de una membrana.

**proteínas de choque térmico** Grupo altamente conservado de proteínas chaperona que se expresan en células expuestas a elevadas temperaturas o a otras formas de estrés medioambiental.

**proteínas de unión a la actina** Proteínas que se unen a la actina y regulan el ensamblaje, desensamblaje y organización de filamentos de actina.

**proteínas de unión al ADN de hebra sencilla** Proteínas que estabilizan el ADN desenrollado uniéndose a las regiones de hebra sencilla.

**proteínas del neurofilamento (NF)** Principales proteínas de los filamentos intermedios de diversos tipos de células nerviosas maduras.

**proteínas ERM** Familia de proteínas que asocian los filamentos de actina a la membrana plasmática de diversos tipos de células.

**proteínas HMGN** Proteínas no histónicas cromosómicas asociadas con la cromatina descondensada, transcripcionalmente activa.

**proteínas integrales de membrana** Proteínas embebidas en el interior de la bicapa lipídica de las membranas celulares.

**proteínas periféricas de membrana** Proteínas indirectamente asociadas con las membranas celulares mediante interacciones proteína-proteína.

**proteínas STAT** Factores de transcripción que tienen un dominio SH2 y que son activadas por la fosforilación de la tirosina, que promueve su translocación desde el citoplasma al núcleo.

**proteínas *scaffold*** Proteínas que se unen a componentes de las vías de señalización, dando lugar a su organización en complejos señalizadores específicos.

**proteínas transmembrana** Proteínas integrales de membrana que se extienden por la bicapa lipídica y que presentan porciones expuestas a ambos lados de la membrana.

**proteínas transportadoras** Proteínas que selectivamente fijan y transportan pequeñas moléculas a través de una membrana.

**proteoglicano** Proteína que se une a los glicosaminoglicanos.

**proteosoma** Gran complejo constituido por proteasas que degrada las proteínas marcadas por la ubiquitina.

**proto-oncogén** Gen celular normal que puede convertirse en un oncogén.

**pseudogén** Copia no funcional de un gen.

**pseudogén procesado** Pseudogén que surge de la transcripción inversa de ARNm.

**pseudopodio** Extensión de la membrana plasmática, constituida por actina, responsable de la fagocitosis y del movimiento ameboide.

**PTEN** Fosfatasa lipídica que defosforila $PIP_3$ y actúa como supresor de tumores.

**punto de restricción** Punto de regulación en ciclo de las células animales que sucede tardíamente en $G_1$. Después de este punto, la célula está destinada a entrar en S y a sufrir un ciclo de división celular.

**puntos de control del ciclo celular** Mecanismos reguladores que impiden la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente se hayan completado.

**queratina** Proteína de los filamentos intermedios de las células epiteliales.

**queratina blanda** Queratinas encontradas en el citoplasma de las células epiteliales.

**queratina dura** Queratina empleada para la producción de estructuras como el pelo, uñas y cuernos.

**quiasmas** Lugares de recombinación por los que se unen los cromosomas homólogos durante la meiosis.

**quinasa de la cadena ligera de miosina** Proteína quinasa que activa a la miosina II fosforilando su cadena ligera reguladora.

**quinasa Janus** Familia de proteína-tirosina quinasas no receptoras asociadas a los receptores de citoquinas.

**quinesina** Proteína motora que migra a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo positivo.

**quitina** Polímero de restos de N-acetilglucosamina que es el principal componente de las paredes celulares fúngicas.

**Rab** Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP que juegan papeles clave en el transporte vesicular.

**Rac** Proteína de bajo peso molecular de unión a GTP implicada en la regulación del citoesqueleto de actina.

**Raf** Proteína-serina/treonina quinasa (codificada por el oncogén raf) que se activa por Ras y que dirige la activación de las MAP quinasas.

**Ran** Pequeña proteína de unión a GTP implicada en la importación y exportación nuclear.

**Ras** Familia de pequeñas proteínas de unión a GTP (codificadas por los oncogenes ras) que acoplan los receptores de factores de crecimiento a las dianas intracelulares, incluyendo a la proteína-serina/treonina quinasa Raf y a la ruta de las MAP quinasas.

**ratón transgénico** Ratón que porta genes no propios incorporados a su línea germinal.

**Rb** Proteína reguladora de la transcripción codificada por un gen supresor de tumores que fue identificada a través del análisis genético de un retinoblastoma.

**RE de transición** Región del RE del que salen las proteínas hacia el aparato de Golgi.

**reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** Método para la amplificación de una región de ADN mediante repetidos ciclos de síntesis de ADN in vitro.

**reacciones lumínicas** Reacciones de la fotosíntesis en las que la energía solar dirige la síntesis de ATP y NADPH.

**reacciones oscuras** Serie de reacciones que convierte el dióxido de carbono y el agua en hidratos de carbono durante la fotosíntesis. Véase ciclo de Calvin.

**RecA** Proteína que estimula el intercambio de hebras entre moléculas homólogas de ADN durante la recombinación.

**recesivo** Alelo enmascarado por un alelo dominante.

**receptor acoplado a proteína-G** Receptor caracterizado por siete $\alpha$-hélices acopladas a la membrana. La unión del ligando provoca un cambio conformacional que activa una proteína-G.

**receptor de célula T** Proteína de superficie de un linfocito T que reconoce antígenos expresados en la superficie de otras células.

**receptor SRP** Proteína de la membrana del retículo endoplásmico que une la partícula de reconocimiento de la señal (SRP).

**receptores de rianodina** Canales de calcio en el músculo y células nerviosas que se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana.

**recombinación** Intercambio de material genético.

**recombinación específica de sitio** Recombinación mediada por proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN.

**recombinación homóloga** Recombinación entre segmentos de ADN con secuencias nucleotídicas homólogas.

**recombinación homóloga general** Intercambio de segmentos entre moléculas de ADN que comparten una homología extensa de la secuencia.

**red de actina** Filamentos de actina que se entrecruzan en redes tridimensionales no densas.

**red del *cis* Golgi** Región del aparato de Golgi en el que las proteínas entran desde el retículo endoplásmico.

**red del *trans* Golgi** Compartimento del Golgi en el que se organizan las proteínas y se empaquetan para salir del aparato de Golgi.

**región no traducida 3'** Región no codificante en el extremo 3' del ARNm.

**región no traducida 5'** Región no codificante en el extremo 5' del ARNm.

**regulación a la baja de receptores** Pérdida de receptores de la superficie celular como resultado de su internalización por endocitosis después de la unión del ligando.

**regulación alostérica** Regulación de enzimas mediante moléculas pequeñas que se fijan a sitios diferentes del centro activo, cambiando la conformación y la actividad catalítica de la enzima.

**reparación acoplada a la transcripción** Reparación preferente de daño en las hebras transcritas de ADN.

**reparación de bases mal apareadas** Sistema de reparación que retira las bases mal emparejadas de las nuevas hebras de ADN sintetizado.

**reparación por escisión de base** Mecanismo de reparación del ADN en el que una única base dañada es retirada de la molécula de ADN.

**reparación por escisión de nucleótido** Mecanismo de reparación del ADN donde los oligonucleótidos que contienen bases dañadas se retiran de la molécula del ADN.

**reparación propensa al error** Forma de reparación en la que las ADN polimerasas especializadas replican a través de un sitio de ADN dañado.

**reparación recombinatoria** Reparación del ADN dañado mediante la recombinación con una molécula homóloga de ADN intacta.

**repetición terminal larga (LTR)** Secuencias de ADN encontradas en los extremos del ADN retroviral y de retrotransposones que son repeticiones directas de varios cientos de nucleótidos y se deben a la actividad de la transcriptasa inversa.

**repeticiones de secuencia sencilla** Clase de secuencias repetidas de ADN que consisten en organizaciones en tandem de miles de copias de secuencias cortas.

**replicación semiconservativa** Proceso de replicación del ADN en el que dos hebras parentales se separan y sirven como moldes para la síntesis de nuevas hebras progenie.

**represor** Molécula reguladora que bloquea la transcripción.

**resolución** Capacidad de un microscopio de distinguir objetos separados por pequeñas distancias.

**retículo endoplasmático (ER)** Red extensa de túbulos y sacos rodeados de membrana, implicados en la clasificación y en el procesamiento de las proteínas así como en la síntesis lipídica.

**retículo endoplasmático liso** Sitio principal de síntesis lipídica en las células eucariotas.

**retículo endoplasmático rugoso** Región del retículo endoplasmático cubierta de ribosomas e implicada en el metabolismo proteico.

**retículo sarcoplásmico** Red especializada de membranas de las células musculares que almacena una alta concentración de $Ca^{2+}$.

**retinoide** Molécula relacionada con el ácido retinoico.

**retroposón** Elemento transponible que se desplaza mediante la transcripción inversa de un intermediario de ARN.

**retrovirus** Virus que se replica haciendo una copia de ADN de su genoma de ARN mediante transcripción inversa.

**Rho** Familia de proteínas de bajo peso molecular de unión a GTP implicadas en la regulación del citoesqueleto.

**ribosa** Azúcar de cinco átomos de carbono presente en el ARN.

**ribosomas** Partículas compuestas por ARN y proteínas y que son los sitios de síntesis proteica.

**ribozima** Enzima ARN.

**RNasa H** Enzima que degrada la hebra de ARN de las moléculas híbridas ARN-ADN.

**RNasa P** Ribozima que corta el extremo 5' de un pre-ARNt.

**rodopsina** Fotorreceptor acoplado a proteína G en los bastones de la retina que activa la transducina en respuesta a la absorción lumínica.

***Saccharomyces cerevisiae*** Levadura que se reproduce por gemación frecuentemente estudiada.

**sarcoma** Cáncer de células de tejido conectivo.

**sarcómero** Unidad contráctil de las células musculares constituido por filamentos de actina y miosina que interaccionan entre sí.

**secuencia de señalización** Secuencia hidrofóbica en el extremo amino de una cadena polipeptídica que la marca en las bacterias para ser secretada o, en las células eucariotas, para que se incorpore al retículo endoplasmático.

**secuencia replicante de forma autónoma (ARS)** Origen de replicación de ADN en levaduras.

**secuencia Shine-Delgarno** Secuencia anterior al sitio de iniciación que alinea los ARNs bacterianos de forma correcta en los ribosomas.

**secuencias espaciadoras** Secuencias de ADN presentes entre los genes.

**segundo mensajero** Compuesto cuyo metabolismo se ve modificado como resultado de una interacción ligando-receptor; actúa como un transductor de señal regulando otros procesos intracelulares.

**selectinas** Moléculas de adhesión celular que reconocen oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula.

**señal de exportación nuclear** Secuencia aminoacídica que marca las proteínas para transportarlas desde el núcleo al citosol.

**señal de localización nuclear** Secuencia aminoacídica que marca las proteínas para transportarlas desde el citoplasma al núcleo.

**señalización autocrina** Tipo de señalización celular en la que una célula produce un factor de crecimiento al cual también ella responde.

**señalización endocrina** Tipo de señalización célula-célula donde células endocrinas segregan hormonas que son llevadas por la circulación a células diana lejanas.

**señalización paracrina** Señalización célula-célula local donde una molécula liberada por una célula actúa sobre la célula diana vecina.

**simporte** Transporte de dos moléculas en la misma dirección a través de una membrana.

**sinapsis** Unión entre una neurona y otra célula, a través de la cual se transmite la información mediante neurotransmisores.

**sinapsis** Asociación de cromosomas homólogos durante la meiosis.

**SINEs (*short interspersed elements*)** Familia de retrotransposones altamente repetidos en los genomas de los mamíferos.

**splicing alternativo** Generación de diferentes ARNm mediante variación del modelo de splicing del pre-ARNm.

**splicing de ARN** Unión de exones en una molécula precursora de ARN.

**Src** Proteína-tirosina quinasa no receptora codificada por el oncogén (*src*) del virus del sarcoma de Rous.

**START** Punto regulador en el ciclo celular de levaduras que sucede al final de $G_1$. Después de este punto, la célula está determinada a entrar en S y sufrir un ciclo de división celular.

**sombreado metálico** Técnica de microscopía electrónica en la que la superficie de una muestra se cubre con una fina capa de metal evaporado.

**sonda** Reactivo que puede detectar selectivamente un ácido nucleico o una proteína específica.

**superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)** Familia de moléculas de adhesión celular que contiene dominios estructurales similares a las inmunoglobulinas.

**superfamilia de los receptores de citoquinas** Familia de receptores de la superficie celular que actúan estimulando la actividad de proteína quinasas intracelulares.

**superfamilia de los receptores nucleares** Familia de factores de transcripción que incluye a los receptores de hormonas esteroídicas, la hormona tiroidea, el ácido retinoico y la vitamina $D_3$.

**sustrato** Molécula sobre la que actúa una enzima.

**talina** Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.

**taxol** Fármaco que se une a los microtúbulos y los estabiliza.

**técnica *patch clamp*** Método empleado para aislar y estudiar la actividad de canales iónicos aislados.

**telofase** Fase final de la mitosis, en la que se vuelve a formar el núcleo y se descondensan los cromosomas.

**telomerasa** Transcriptasa inversa que sintetiza secuencias repetidas teloméricas en los extremos de los cromosomas a partir de su propio molde de ARN.

**telómeros** Repeticiones de secuencias sencillas de ADN que mantienen los extremos de los cromosomas lineales.

**testosterona** Hormona esteroidea producida por los testículos.

**timina** Pirimidina que se encuentra en el ADN emparejada con adenina.

**titina** Proteína grande que actúa como resorte para mantener a los filamentos de miosina centrados en el sarcómero muscular.

**topoisomerasa** Enzima que cataliza la rotura reversible y reunificación de las hebras de ADN.

**traducción** Síntesis de una cadena polipeptídica a partir de un molde de ARNm.

**Traducción *in vitro*** Síntesis proteica en un extracto libre de células.

**transcitosis** Clasificación y transporte de proteínas a diferentes dominios de la membrana plasmática después de una endocitosis.

**transcripción** Síntesis de una molécula de ARN a partir de un molde de ADN.

**transcripción inversa** ADN polimerasa que usa un molde de ARN.

**transducción intracelular de señales** Cadena de reacciones que transmiten señales químicas desde la superficie celular a sus objetivos intracelulares.

**transducina** Proteína G que estimula la GMPc fosforidesterasa, al ser activada por rodopsina.

**transfección** Introducción de un gen extraño en células eucariotas.

**transferencia génica** Introducción de un ADN extraño en el interior de una célula.

**transferencia Northern** Método en el que los ARNm son separados mediante una electroforesis en gel y detectados por hibridación con sondas específicas.

**transferencia Southern** Método en el que se emplean sondas radioactivas para detectar fragmentos específicos de ADN que han sido separados por electroforesis en gel.

**transferencia Western** Ver Inmunotinción.

**transformación** Transferencia de ADN entre bacterias genéticamente distintas. Véase también transformación celular.

**transformación celular** Conversión de células normales en células tumorales en cultivo.

**translocón** Canal de membrana a través del cual se transportan cadenas de polipéptidos al interior del retículo endoplásmico.

**transportadores ABC** Gran familia de proteínas de transporte de membrana caracterizadas por presentar un dominio de unión de ATP altamente conservado.

**transporte activo** Transporte de moléculas en una dirección energéticamente desfavorable, a través de la membrana, acoplado a la hidrólisis de ATP u a otra fuente de energía.

**transporte pasivo** Transporte de moléculas a través de la membrana en una dirección energéticamente favorable.

**transposición** Movimiento de las secuencias de ADN por todo el genoma.

**transposón** Secuencia de ADN que puede migrar a diferentes posiciones dentro del genoma.

**transposones de ADN** Elementos transponibles que se mueven mediante intermediarios de ADN.

**triacilglicerol** Tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.

**tromboxano** Eicosanoide implicado en la coagulación sanguínea.

**tropomiosina** Proteína fibrosa que se une a los filamentos de actina y que regula la contracción mediante el bloqueo de la interacción entre actina y miosina.

**troponina** Complejo de proteínas que se une a los filamentos de actina y regula la contracción del músculo esquelético.

**tubulina** Proteína citoesquelética que polimeriza para formar microtúbulos.

**tumor** Cualquier proliferación anormal de las células.

**tumor benigno** Tumor que permanece confinado en su sitio de origen.

**tumor maligno** Tumor que invade un tejido normal y se extiende por todo el cuerpo.

**ubiquinona** Ver coenzima Q.

**ubiquitina** Proteína altamente conservada que actúa como marcador para conducir a otras proteínas celulares a una rápida degradación.

**ultracentrífuga** Centrífuga que rota las muestras a altas velocidades.

**unión adherente** Región de adhesión célula-célula mediante la cual el citoesqueleto de actina se ancla a la membrana plasmática.

**unión de tipo gap** Canal de membrana plasmática que forma una conexión citoplasmática directa entre células adyacentes.

**unión estrecha** Red continua de hebras proteicas alrededor del perímetro de las células epiteliales, sellando el espacio entre las células y formando una barrera entre los dominios apical y basolateral.

**unión Holliday** Intermediario central en la recombinación, constituido por una estructura de hebras cruzadas formada por emparejamiento de bases homólogas entre las hebras de dos moléculas de ADN.

**uniporte** Transporte de una única molécula a través de una membrana.

**uracilo** Pirimidina que se encuentra en el ARN y que se empareja con adenina.

**vacuola** Gran saco rodeado por una membrana en el citoplasma de las células eucariotas. En las células vegetales, la función de las vacuolas es almacenar nutrientes y productos de desecho, degradar macromoléculas, y mantener la presión de turgencia.

**vector** Molécula de ADN empleada para dirigir la replicación de un fragmento de ADN clonado en el interior de una célula hospedadora.

**vector de expresión** Vector empleado para dirigir la expresión de un fragmento de ADN clonado en una célula hospedadora.

**vesícula del Golgi** Compartimentos del aparato de Golgi en el que tienen lugar la mayoría de las actividades metabólicas.

**vesícula revestida de clatrina** Vesícula de transporte tapizada con clatrina.

**vesícula revestida de COP** Vesícula de transporte revestida de proteínas distintas de la clatrina (COP indica *coat protein*).

**vesícula sináptica** Vesícula secretora que libera neurotransmisores a una sinapsis.

**vesículas secretoras** Sáculos rodeados por una membrana que transportan proteínas desde el aparato de Golgi a la superficie celular.

**vía JAK/STAT** Vía de señalización en la que los factores de transcripción STAT son activados como resultado de la fosforilación por miembros de la familia JAK de proteína quinasas.

**vía secretora** Movimiento de proteínas secretadas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, después, en el interior de vesículas secretoras, a la superficie celular.

**villina** Principal proteína formadora de haces de actina en las microvellosidades intestinales.

**vimblastina** Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

**vimentina** Proteína de los filamentos intermedios encontrada en una diversidad de tipos celulares.

**vincristina** Fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos.

**vinculina** Proteína que media la asociación de filamentos de actina con integrinas en las adhesiones focales.

**virus de Epstein-Barr** Herpesvirus humano que causa los linfomas de células B.

**virus de la hepatitis B** Familia de virus de ADN que infectan a las células del hígado y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

**virus de la hepatitis C** Familia de virus de ARN que infectan células hepáticas y pueden desencadenar el desarrollo de cáncer hepático.

**virus de los simios 40 (SV40)** Virus tumoral de ADN ampliamente estudiado.

**virus del sarcoma de Rous (RSV)** Retrovirus altamente transformante, donde se identificó el primer oncogén.

**virus tumoral** Virus capaz de causar un cáncer en animales o humanos.

***Xenopus laevis*** Rana africana empleada como sistema modelo en biología experimental.

**zigoteno** Estadio de meiosis I donde los cromosomas homólogos llegan a estar íntimamente asociados.

**zigoto** Óvulo fecundado.

**zona señalizadora** Determinante de reconocimiento formado por el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica.

# Índice